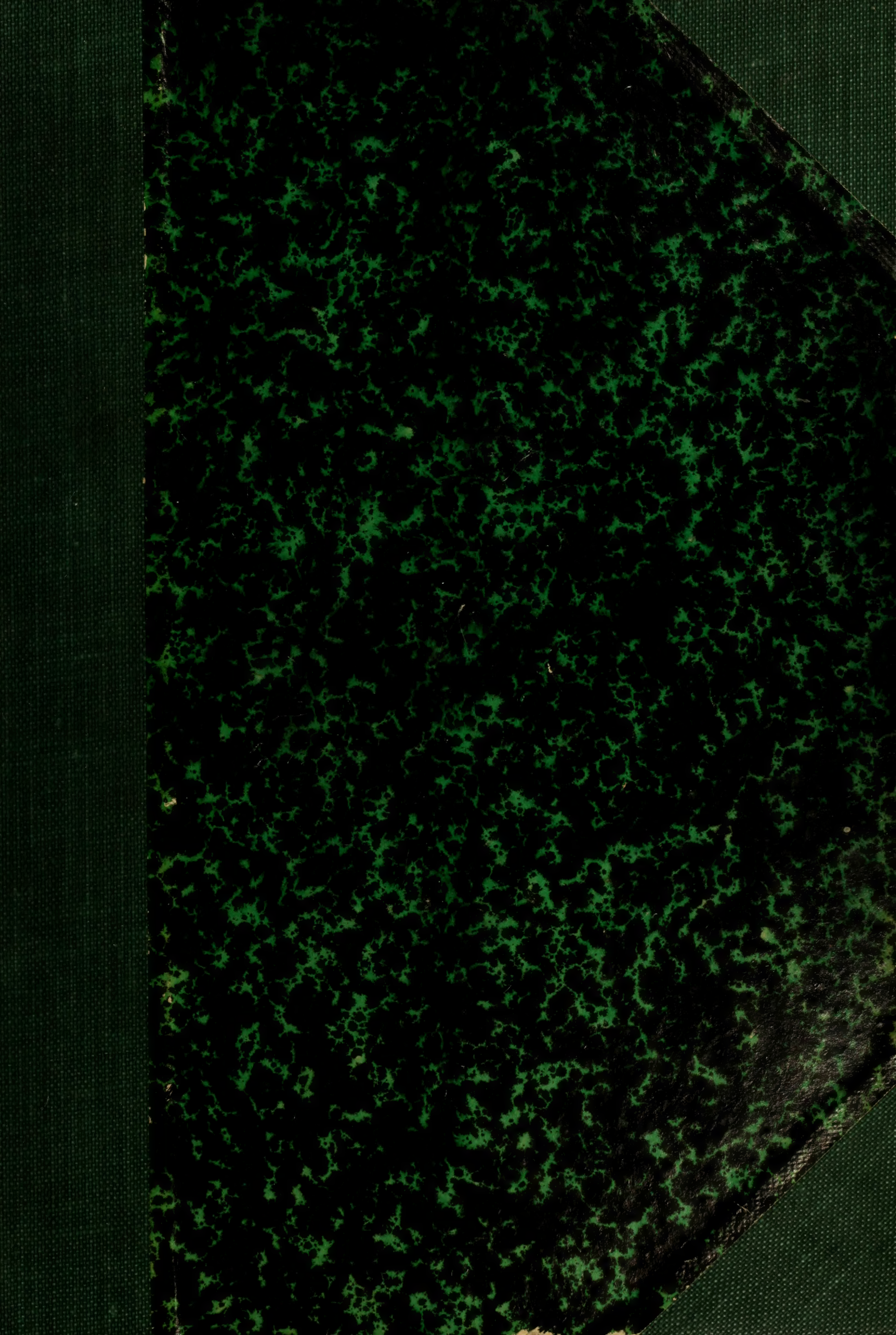


BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

VIERTER BAND

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

VIERTER BAND

BRAUNSCHWEIG

VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1904

INHALT.

A. Abhandlungen.

B. Kürzere Mitteilungen.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

IV. Band. 1. und 2. Heft

(Ausgegeben Mai 1903)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1903

Inhalt des 1. und 2. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

I.

Über die optische Aktivität des Hämoglobins und des Globins.

Von **Arthur Gamgee,**

M. D., F. R. S., emer. Prof. der Physiologie am „Owens College, Victoria University"

und

A. Croft Hill, M. A., M. B.

Alle bisher veröffentlichten Beobachtungen über die optische Aktivität der Eiweiß-Substanzen haben ergeben, daß die letzteren, ob vegetabilischer oder animaler Herkunft, ausnahmslos die Polarisations-Ebene nach links drehen. Ein Fall von Rechtsdrehung oder Inaktivität war bei ihnen bisher nicht bekannt.*)

Es gibt nun eine Gruppe von Eiweiß-Substanzen, welche, trotzdem sie Körper von hohem physiologischem und chemischem Interesse umfaßt, hinsichtlich ihrer optischen Aktivität bisher vollkommen vernachlässigt worden ist. Das ist die Gruppe, welche von den deutschen Autoren als „Proteïde" bezeichnet worden ist. Diese Gruppe umfaßt jene hochzusammengesetzten Eiweiß-Substanzen, welche mehr oder minder leicht gespalten werden können und dabei einerseits Eiweiß, andererseits Farbstoffe, Nucleïne oder Nucleïnsäuren und, als Zersetzungsprodukte der letzteren, Purinbasen liefern. Die hauptsächlichsten und charakteristischsten Glieder dieser Gruppe sind: 1) die Hämoglobine und deren Verbindungen, 2) die Nucleoproteïde und die Nucleïne.

Die Proteïd-Verbindung „Hämoglobin" zeichnet sich vor allen anderen Gliedern der Eiweißgruppe aus durch ihre Farbe, durch ihre merkwürdige Fähigkeit leicht spaltbare Verbindungen mit Sauerstoff und gewissen anderen Gasen zu bilden, ferner durch die ihr eigentümliche leichte Krystallisierbarkeit und Fähigkeit der Rekrystallisation, dadurch, daß sie sich frei von allen fremden Mineral-Substanzen darstellen läßt, endlich durch

*) Vgl. die Anmerkung am Schlusse der folgenden Arbeit.

die staunenswerte Eigenschaft, daß ihre Lösungen keine der charakteristischen Reaktionen gelöster Eiweiß-Substanzen geben, solange nämlich als sie noch keine fundamentale Zersetzung durch ein Reagens erlitten haben, durch welche eine Trennung des Eiweißes und des Farbstoffes erfolgt.

Zudem haben Untersuchungen des einen von uns kürzlich gezeigt, daß, während Hämoglobin ein diamagnetischer Körper ist, seine durch Säuren gewonnenen eisenhaltigen Zersetzungsprodukte nicht bloß paramagnetisch, sondern überhaupt — soviel bisher bekannt — die mächtigsten „ferromagnetischen" organischen Körper sind.*)

Diese, hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften, so völlige Verschiedenheit des Hämoglobins von seinen unmittelbaren Zersetzungsprodukten ist so auffällig, daß es höchst interessant erschien zu prüfen, ob das Hämoglobin auch hinsichtlich seiner optischen Aktivität sich — wie ein echter Eiweißkörper — als „linksdrehend" erweist. War es möglich diese Frage zu entscheiden, so mußte der nächste Schritt der Forschung sein, die optische Aktivität der eiweißhaltigen Produkte und der Farbstoff-Produkte des Hämoglobin-Moleküls zu bestimmen.

1. Bestimmung der optischen Aktivität des Hämoglobins.
Dasselbe ist rechtsdrehend.

Soviel uns bekannt, ist das Verhalten von Lösungen farbiger organischer Körper in bezug auf ihre optische Aktivität bisher nicht zum Gegenstande ernster Untersuchung gemacht worden. Landolt**) erwähnt in der letzten Ausgabe seines maßgebenden Werkes, in welchem alle zuverlässigen Mitteilungen über die optische Wirksamkeit organischer Körper verzeichnet sind, nur einen rechtsdrehenden vegetabilischen Farbstoff, das Hämatoxylin. Seine alkoholische Lösung soll die Polarisationsebene nach rechts drehen. Daß das Studium der optischen Aktivität farbiger Lösungen darniederlag, kann uns nicht Wunder nehmen, wenn man bedenkt, um wie viel größer die Schwierigkeiten sind, die sich ihrer Unter-

*) A. Gamgee: „On the behaviour of Oxy-Hämoglobin, Carbonic-oxide-Hämoglobin, Methämoglobin, and certains of their derivatives in the Magnetic Field, with a Preliminary note on the Electrolysis of the Hämoglobin Compounds." (Proceed. of The Royal Society, Vol. 68, p. 503.)

A. Gamgee: The Croonian Lecture for 1902. „On certain Chemical and Physical Properties of Hämoglobin." (Proceed. of The Royal Society, Vol. 70, p. 79.)

**) Dr. H. Landolt, Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen etc. Zweite gänzlich umgearbeitete Auflage. Vieweg u. Sohn. 1898.

suchung entgegenstellen, im Vergleiche mit der Prüfung farbloser Flüssigkeiten.

Untersuchungsmethode.

Setzt man eine 1 cm dicke Schichte einer 0,9 Proz. Oxy- oder CO-Hämoglobin enthaltenden Lösung dem Durchtritte eines starken weißen Lichtstrahles aus, so bleibt von dem ganzen Spektrum einzig nur jener Teil unabsorbiert, welcher von der Linie B bis nahe an die rote Seite von D reicht. Daraus ging hervor, daß wir für unsere Versuche nur rotes Licht brauchen konnten und daß anstatt eines der gewöhnlichen in Laboratorien gebräuchlichen Polarimeter, deren Einrichtung nur ihre Anwendung für Licht einer bestimmten Wellenlänge gestattet (die Halbschatten-Polarimeter vom Typus Laurent sind für monochromatisches Natriumlicht eingerichtet), ein Apparat angewendet werden mußte, der die Untersuchung in Licht von beliebiger Wellenlänge zuließ.

Anfangs bedienten wir uns versuchsweise der Lithiumflamme als Lichtquelle, allein es war unmöglich, damit ein genügend intensives oder konstantes Licht zu erzielen. Daher benutzten wir fürderhin das Licht einer Bogenlampe nach seinem Durchtritt durch Landolts Filter für rote Strahlen.

Dieses Lichtfilter besteht aus einer Doppelkammer von je 20 mm Tiefe. Die eine derselben enthält eine Lösung von Hexamethylpararosanilin, das im Handel unter dem Namen „Krystallviolett“ 5 BO erhältlich ist. Von dieser Verbindung wird 0.05 g in wenig Alkohol gelöst und dann mit Wasser bis zu einem Liter verdünnt. Läßt man Licht durch eine 20 mm dicke Schicht dieser Lösung treten, so erhält man als Spektrum einen schmalen roten Streifen und einen breiten blauvioletten Teil. Enthält nun die zweite Abteilung der Doppelkammer eine Lösung von 10 g Kaliumchromat auf 100 ccm aq. dest., so wird auch das Blauviolett vollständig absorbiert, und vom Spektrum bleibt nur ein schmales Band, welches von λ 718 bis λ 639 $\mu\mu$ reicht und hier scharf abgegrenzt endet. Der „optische Schwerpunkt“ entspricht λ 665 $\mu\mu$, während die Wellenlänge von C = λ 656,3 $\mu\mu$ beträgt.*)

Mit Hilfe des Lichtfilters erhielten wir einen annähernd homogenen roten Lichtstrahl von der mittleren Wellenlänge der Linie C und von genügender Intensität, um Beobachtungen mit Lösungen von etwa 1 g Hämoglobin auf 100 ccm Wasser zuzulassen. In den verschiedenen Beobachtungs-Serien benutzten wir Röhren von 100 mm und 200 mm Länge.

Als Polarimeter diente uns bei unseren Versuchen ein vorzügliches Lippichsches „Halbschattenpolarimeter“ mit dreiteiligem Gesichtsfeld, von Schmidt u. Haensch (Berlin) verfertigt, Eigentum des „Davy-Faraday Laboratory of the Royal Institution of Great Britain“.

*) Landolt, op. cit. pp. 387—390.

Das verwendete Hämoglobin.

Die Hämoglobin-Lösungen, welche in diesen Bestimmungen angewandt wurden — die Resultate geben wir weiter unten — waren aus Oxy-Hämoglobin von bemerkenswerter Reinheit hergestellt worden, welches aus Pferdeblut nach dem Verfahren von Zinoffsky*) und zwar nach seiner besten (der dritten) Methode gewonnen war.

Es wurden zwei Präparate von Hämoglobin verwendet, die im Großen und in einem Zwischenraum von mehreren Monaten bereitet waren. Das Oxyhämoglobin war dreimal umkrystallisiert; das Produkt wurde jedesmal nach dem Krystallisieren viele Male mit eiskaltem, destilliertem Wasser gewaschen, dessen Reinheit durch Bestimmung seines elektrischen Widerstandes kontrolliert war. Die Lösung enthielt 2,446 g Hämoglobin in 100 ccm. Behufs polarimetrischer Prüfung wurde diese Lösung mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt. Diese Lösung enthielt daher bei der Prüfung 1,223 g Oxyhämoglobin in 100 ccm.

Das zur Herstellung der CO-Hämoglobin-Lösung verwendete Präparat war viermal umkrystallisiert worden. Nach jeder einzelnen Krystallisation waren die Krystalle wie das Oxyhämoglobin mit reinem destilliertem Wasser gewaschen worden. Die Lösung der gewaschenen Krystalle der vierten Krystallisation wurde mit CO gesättigt. Diese Lösung enthielt 1,84 g trockenen CO-Hämoglobins. Behufs polarimetrischer Messung wurde sie mit einem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt. Die Lösung enthielt bei der polarimetrischen Untersuchung demgemäß 0,92 g CO-Hämoglobin in 100 ccm.

Versuche.

A. Oxy-Hämoglobin.

Die oben bezeichnete verdünnte Lösung von Oxyhämoglobin, welche 1,223 g Hämoglobin in 100 ccm enthielt, wurde gründlich mit O gesättigt, bevor sie der polarimetrischen Prüfung unterzogen wurde.

In allen Beobachtungsreihen wurde das 1 Dezimeter-Rohr verwendet. Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

	Beobachteter Winkel	Spezif. Drehung $(\alpha)_c$
1. Mittel der ersten Beobachtungsreihe	+ 0°.12	+ 9°.8
2. „ „ zweiten „	+ 0°.125	+ 10°.2
3. „ „ dritten „	+ 0°.1225	+ 10°.0.

Aus obigen Beobachtungen schließen wir auf die spezifische Drehung des Oxy-Hämoglobins für Licht mittlerer Wellenlänge von C, $(\alpha)_C = + 10^\circ.0 \pm 0^\circ.2$.

B. CO-Hämoglobin.

Mit der oben beschriebenen, verdünnten CO-Hämoglobin-Lösung, welche 0,92 g CO-Hämoglobin in 100 ccm enthielt, wurden zwei Beob-

*) Zinoffsky, O., „Über die Größe des Hämoglobin-Moleküls". Zeitschrift f. physiol. Chemie. **10**, 23 (1886).

achtungsreihen vorgenommen, die erste mit dem 1 Dezimeter-Rohr, die zweite mit dem 2 Dezimeter-Rohr.

	Länge des Rohrs	Beobachteter Winkel	Spezifische Drehung
1. Mittel der ersten Beobachtungsreihe	1 Dezim.	+ 0°.098	+ 10°.65
2. „ „ zweiten „	2 „	+ 0°.203	+ 11.03.

Als Mittel beider Beobachtungsreihen erhalten wir für die spezifische Drehung einer Lösung von CO-Hämoglobin (Gehalt von 0,92 g auf 100 ccm.)

$$(\alpha)_C = + 10°.8.$$

Berücksichtigt man das schwache Drehungsvermögen des Hämoglobins, so muß das Übereinstimmen des Drehungsvermögens für Oxy- und CO-Hämoglobin befriedigend berühren und die Schlußfolgerung nahelegen, daß die Anlagerung des Sauerstoff- oder Kohlenoxyd-Moleküls an das Hämoglobin seine spezifische Drehung nicht beeinflußt. Den Beweis für die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung lieferte das direkte Experiment.

C. Dieselbe Hämoglobin-Lösung, das eine Mal mit O, das andere Mal mit CO gesättigt und verglichen.

Um durch das direkte Experiment zu bestimmen, ob die lockere Verbindung des Hämoglobins mit O und mit CO einen Einfluß auf die spezifische Drehung desselben ausübt, wurden Versuche mit derselben Oxyhämoglobinlösung ausgeführt, deren wir uns für die drei Beobachtungsreihen unter A bedient hatten und die 1,223 g in 100 ccm Wasser enthielt. Eine Portion dieser Lösung war mit O gesättigt; eine andere Portion wurde mit CO bis zur vollständigen Verjagung des O aus seiner Verbindung mit Hämoglobin und dessen Ersatz durch CO geschüttelt. In dieser Weise erhielten wir zwei Lösungen, welche völlig identisch waren, bis auf den Umstand, daß in dem einen Falle das Hämoglobin mit O, in dem anderen mit CO verbunden war. Die Lösungen wurden in Röhren derselben Länge und unter den gleichen Beleuchtungsbedingungen geprüft. Es ergab sich in beiden Fällen gleiche Drehung; der mittlere Wert derselben entspricht der spezifischen Drehung $(\alpha)_C = + 10°.0$.

Es muß bemerkt werden, daß die unter A und C mitgeteilten Beobachtungen später als die mit CO-Hämoglobin unter B vorgenommen wurden. Besonders in den Beobachtungen sub A war, infolge der vorher gewonnenen Erfahrung, die Intensität und Gleichmäßigkeit des verwendeten monochromatischen Lichtes befriedigender als in den Beobachtungen sub B. Wir sind daher geneigt, die Zahlen, wie wir sie für die spezifische Drehung des Hämoglobins als Resultat der Beobachtungen

sub A erhielten, als die zuverlässigeren zu betrachten, ohne behaupten zu wollen, daß diese Zahlen durchaus endgültige sind. Sie kommen aber unseres Erachtens der Wahrheit sehr nahe.

2. Bestimmung der optischen Aktivität des Globins.

Dasselbe ist linksdrehend.

Mit Globin bezeichnete Preyer das eiweißhaltige Produkt der spontanen Zersetzung des Hämoglobins, ohne jedoch im stande zu sein, dessen Eigenschaften, seine chemische Zusammensetzung, sein Verhältnis zu anderen Eiweiß-Substanzen näher feststellen zu können. Wir verdanken Fr. N. Schulz*) eine Untersuchung verhältnismäßig jüngeren Datums, deren Resultate bereits von Ivar Bang**) im wesentlichen bestätigt worden sind, und welche wertvolle und vielversprechende Tatsachen betreffs der bei der Zersetzung des Hämoglobins entstehenden hauptsächlichsten Produkte zu Tage gefördert hat. Schulz hat gezeigt, daß eine Lösung von Hämoglobin, durch Zufügung kleiner Mengen Salzsäure gespalten, als Hauptbestandteile liefert: 4,2 Proz. Hämatin und 86,5 Proz. einer charakteristischen Eiweiß-Substanz, für welche er den Namen Globin beibehält. Er hat ferner gezeigt, daß diese Substanz der Klasse der „Histone" angehört, und es hätte sich vielleicht empfohlen, den neuen Körper etwa „Hämato-Histon" zu nennen, um sowohl seine Herkunft als seine Affinität zu bezeichnen.

Die Methode der Globin-Bereitung wird von Schulz im wesentlichen geschildert wie folgt:

Zu einer Lösung krystallinischen Hämoglobins, das man entweder nach dem Verfahren Hoppe-Seylers oder nach der Ammoniumsulfat-Methode gewonnen hat, wird verdünnte Salzsäure in minimaler Menge zugegossen, bis sich ein flockiger Niederschlag bildet, der bei dem geringsten Säure-Überschuß sich sofort löst. Jetzt hat die Lösung nicht mehr die schöne rote Farbe des Hämoglobins, sondern ist braun geworden. Nicht nur — bemerkt Schulz — hat sich die Farbe geändert, sondern zwischen dem eiweißhaltigen Bestandteil des Hämoglobins und seinem Farbstoff ist eine vollständige Trennung eingetreten. Wird nun zu dieser Lösung, die jetzt schwach sauer reagiert, etwa $^1/_5$ seines Volumens an 80-proz. Alkohol zugegossen und die Mischung mit Äther ausgeschüttelt, so geht „der ganze Farbstoff in den Äther über", während die untere wässerig-alkoholische, klare Lösung die entfärbte Eiweiß-Substanz enthält. Hinsichtlich der notwendigen Vorsichts-Maßregeln, um die vollständige Trennung der Eiweiß-Lösung von dem Farbstoff sicher zu stellen, gibt Schulz besondere Winke und betont dabei, daß Wasser, Alkohol und Äther in bestimmtem Verhältnisse stehen müssen,

*) Schulz, Dr. Fr. N.: „Die Eiweißkörper des Hämoglobins." Zeitschr. f. physiol. Chemie. 24, 449 (1898).

**) Bang, Ivar: „Studien über Histon." Zeitschr. f. physiol. Chemie. 27, 463 (1899).

was für jeden einzelnen Fall erst experimentell festgestellt werden müsse. Durch obigen Vorgang erhält man eine mehr oder minder braun-gelbe Lösung, welche sowohl Alkohol als Wasser enthält und schwach sauer reagiert. Wenn man diese Lösung mit Ammoniak neutralisiert, so scheidet sich ein schwach gelber, grobflockiger Niederschlag aus. Dieser wird schnell abfiltriert und dann mit Wasser gewaschen. Wenn der Ammoniak-Überschuß entfernt ist, so beginnt der Niederschlag sich im Waschwasser zu lösen. In diesem Stadium wird er in Wasser, mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure, gelöst. Es geschieht dies schnell und vollständig. Der Säure-Überschuß wird mittels mehrtägiger Dialyse gegen destilliertes Wasser entfernt; auf diese Weise erhält man eine klare, geruchlose und geschmacklose Lösung von Globin, welche ganz neutral reagiert.

Es kann nicht unsere Absicht sein, hier auf die Reaktionen einzugehen, welche Globin-Lösungen eigen sind und welche Schulz bewogen haben, es den „Histonen" einzureihen.

Bevor wir in Kürze die von uns angewandten Methoden der Darstellung von Globin-Lösungen, welche wir optisch untersucht haben, beschreiben, erscheint es wünschenswert, einigen Bemerkungen hinsichtlich einzelner Angaben von Schulz Raum zu geben. Bei der Besprechung der Salzsäure-Menge, welche man braucht, um Hämoglobin zu zersetzen, bemerkt Schulz lediglich, daß außerordentlich kleine Mengen genügen. („Die zu der Spaltung erforderliche Menge von Säure ist außerordentlich gering etc.") Wir haben diese Menge genauer bestimmt. Das Ergebnis sehr sorgfältiger Versuche mit einer Lösung von 1,84 g auf 200 ccm Wasser war, daß 20 ccm $^1/_{10}$ Normal HCl nötig waren, um eine vollständige Trennung des Globins vom Farbstoff zu erzielen.

Wir fanden ferner, daß Äther, wenn das Schütteln nicht mehrmals wiederholt wird, nicht allen Farbstoff aufnimmt. Zeigt nach der Ätherausschüttelung die wässerig-alkoholische Globinlösung auch nur die feinste Nüance von Strohgelb, so fällt das Globin bei der Neutralisation mit Ammon zwar anfänglich farblos aus, nimmt dann aber eine rötliche Färbung an und erscheint bei nachträglicher Lösung in leicht angesäuertem Wasser viel tiefer gefärbt, als die ursprüngliche wässerig-alkoholische Lösung.

Für die polarimetrischen Untersuchungen stellten wir die Lösung auf folgende Weise her:

Von einer Lösung viermal umkrystallisierten Hämoglobins wurden 100 ccm, welche 1,84 g Substanz enthielten, mit 100 ccm Wasser verdünnt und mit 20 ccm $^1/_{10}$ Normal-Salzsäure behandelt. Hierauf wurde die Flüssigkeit mit 44 ccm absoluten Alkohols versetzt, und in einem Scheidetrichter anhaltend mit dem gleichen Volumen Ather geschüttelt. Nachdem die wässerig-alkoholische Flüssigkeit von der darüber schwimmenden, ätherischen Lösung des Farbstoffs sich abgesetzt hatte, wurde noch zweimal

mit frischen Äther-Mengen geschüttelt. Bei Einhaltung dieses Verfahrens gelang die Abtrennung der Globinlösung schon nach einmaligem Schütteln; die Lösung hatte nach dreimaligem Schütteln nur eine Spur von Strohfarbe. In gewissen Fällen wurde das Globin nach dem Verfahren von Schulz durch Ausfällen mit Ammon abgeschieden, der flockige Niederschlag darauf in sehr verdünnter Essigsäure gelöst. Auf diese Weise war die Globin-Lösung für die erste Reihe von Bestimmungen, über welche unten berichtet werden wird, hergestellt. Da es aber so nicht gelang, genügend farblose Lösungen zu erzielen, um die Bestimmung ihres Drehungsvermögens mit völliger Sicherheit für Licht von der Wellenlänge D vorzunehmen, so ermittelten wir wie beim Hämoglobin das Drehungsvermögen für Licht von der mittleren Wellenlänge C.

In der zweiten Beobachtungs-Reihe wurde das Drehungsvermögen der wässerig-alkoholischen Lösung, die durch Zersetzung des Hämoglobins erhalten worden war, nach gründlichem Schütteln mit Äther bestimmt.

Nachdem vorläufige Beobachtungen gezeigt hatten, daß Globin-Lösungen optisch aktiv sind und zwar linksdrehend, wurden die folgenden Versuchsreihen vorgenommen, in der Absicht, das spezifische Drehungsvermögen dieser Substanz zu bestimmen.

Versuch 1.

Eine Globin-Lösung in destilliertem Wasser, dem ein wenig Essigsäure zugesetzt war, wurde bei derselben Versuchsanordnung in rotem Lichte geprüft wie oben das Hämoglobin. Die Lösung enthielt 2,4 g Globin in 100 ccm. Sie gab in ganz charakteristischer Weise die Reaktionen des Globins.

Die benutzte Röhre war 0,1 m lang.

Der Drehungswinkel wurde im Mittel vieler Bestimmungen zu — $1^{\circ}.30$ gefunden. Nach obiger Berechnung folgt daraus für die schwach saure Globin-Lösung von 2,4 Proz. Gehalt

das spezifische Drehungsvermögen

$$[\alpha]_C = -54^{\circ}.2.$$

Versuch 2.

Die ganz schwach strohgelbe Lösung, welche bei der Spaltung des Hämoglobins durch verdünnte Salzsäure entstanden, dann mit Alkohol und Äther behandelt worden war, wurde erst in einer flachen Schale durch mehrere Stunden dem Luftzug ausgesetzt und hiernach auf dem Wasserbade, bei 40° C, ganz von Äther und zum Teil von Alkohol befreit. Die vollkommen klare, strohfarbene Lösung hatte bei 16° C eine Dichte von 987,4 und enthielt 0,98 g fester Substanz in 100 ccm. Diesmal wurde monochromatisches Natriumlicht für die polarimetrischen Beobachtungen benutzt.

Die Röhre hatte 0,1 m Länge.

Der Drehungswinkel betrug im Mittel vieler Bestimmungen — $0^{\circ}.64$. Nach obiger Berechnung folgt für diese schwach saure, wässerig-alkoholische Globin-Lösung vom Gehalt 0,98 Proz. fester Bestandteile

das spezifische Drehungsvermögen

$$[\alpha]_D = -65^{\circ}.5.$$

Es muß hervorgehoben werden, daß der Unterschied in den Resultaten der beiden ausgeführten polarimetrischen Messungen sich zum größten Teile auf die Differenz der Wellenlängen des verwendeten Lichtes (C und D) zurückführen läßt.

3. Schlußbemerkungen.

Aus den hier geschilderten Versuchen ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

1. Hämoglobin ist ein rechtsdrehender Körper.

2. Globin, das hauptsächlichste oder, wie wir anzunehmen geneigt sind, das einzige Produkt eiweißartiger Natur der durch stark verdünnte Salzsäure erfolgenden Spaltung des Hämoglobins, erweist sich, hinsichtlich seines Verhaltens zum polarisierten Licht, als eine normale Eiweiß-Substanz, d. h. es ist ein linksdrehender Körper.

Obwohl die Zahlen, welche wir für das spezifische Drehungsvermögen der von uns geprüften Körper ermittelt haben, als recht nahe Wahrscheinlichkeitswerte angesehen werden müssen, so möchten wir doch ausdrücklich hervorheben, daß sie vielleicht einer Nachprüfung bedürfen. Betreffs des Hämoglobins müßten die Bestimmungen mit einer reineren monochromatischen und intensiveren Lichtquelle als der von uns benutzten vorgenommen werden, und beim Globin müßte mit einem reineren Präparat gearbeitet werden als bei der gegenwärtigen, lückenhaften Kenntnis dieses Körpers möglich ist.

Wir hoffen, diese Untersuchungen weiterführen zu können, und werden der optischen Aktivität der farbigen Zersetzungsprodukte des Hämoglobin-Moleküls, namentlich dem Hämochromogen und Hämatin und dessen farbigen Abkömmlingen, unsere Aufmerksamkeit zuwenden.

Schließlich danken wir den Leitern des Davy-Faraday-Laboratory of the Royal Institution für ihr Entgegenkommen, welches uns die Durchführung des optischen Teils unserer Arbeit wesentlich erleichtert hat.

II.

Über die Nucleoproteide des Pankreas, der Thymus und der Nebenniere, mit besonderer Berücksichtigung ihrer optischen Aktivität.

Von **Arthur Gamgee,**

M. D., emerit. Professor der Physiologie am Owens College, Victoria-Universität,

und

Walter Jones,

Ph. D., Associate Professor der Physiologischen Chemie an der John Hopkins Universität.

I. Bibliographischer und kritischer Teil.

Bei Untersuchungen, welche der eine von uns gemeinsam mit Dr. A. Croft Hill ausgeführt hat*), war die Entdeckung gemacht worden, dass das Hämoglobin die Polarisationsebene nach rechts dreht, während die daraus erhältliche histonartige Eiweiß-Substanz, das Globin, dessen Eigenschaften und Darstellungsweise erst seit den Forschungen von Fr. N. Schulz bekannt geworden sind, ein linksdrehender Eiweißkörper ist.

Diese interessanten Beobachtungen machten es wahrscheinlich, daß auch die Nucleoproteide, ähnlich wie Hämoglobin, sich als rechtsdrehend erweisen dürften. Die ersten Resultate der hierauf gegründeten Untersuchungen sollen den Gegenstand dieser Mitteilung bilden. Wie aus dem Folgenden zu ersehen ist, bestätigte sich unsere Vermutung, und es ist damit erwiesen, daß wenigstens einige Glieder der für die Lebensvorgänge im Organismus so wichtigen Gruppe der Eiweißkörper rechtsdrehende Substanzen sind.

Als notwendige Vorbedingung für unsere speziellen Untersuchungen erschien es, Nucleoproteide von solcher Reinheit und insbesondere so frei von jedwedem Farbstoff zu gewinnen, daß damit Lösungen hergestellt werden konnten, deren Durchsichtigkeit und Farblosigkeit die polarimetrische Untersuchung gestattete.

---

*) S. die vorangehende Arbeit.

Einleitende Bemerkungen über „Nucleoproteide“ und „Nucleine“ und über die Bedeutung dieser Bezeichnungen.

Mit dem Ausdruck „Nucleoproteide“ bezeichnen wir Komplexe oder besser Verbindungen von Eiweißsubstanzen, welche im Kernprotoplasma aller Organe des tierischen Körpers, insbesondere aber der Drüsen mit oder ohne Ausführungsgang enthalten und dadurch charakterisiert sind, daß sie reichlich Phosphor und konstant etwas Eisen enthalten, daß sie unter dem Einfluß von Hitze, von Säuren, Alkalien und besonders von Pepsin und Salzsäure, bei günstiger Temperatur, sich in Eiweißstoffe und in sogenannte echte Nucleine (nicht Pseudo-Nucleine) spalten. Diese „echten Nucleine“ stellen sonach als Spaltungsprodukte nur einen Bruchteil des ursprünglichen Nucleoproteids dar. Sie sind sekundäre, wir könnten sagen, degradierte Nucleoproteide, enthalten aber den gesamten Phosphor der Muttersubstanz.

Unter der Einwirkung kaustischer Alkalien und höherer Temperatur liefern die Nucleine als Zersetzungsprodukte Eiweißsubstanzen und die sogenannten „Nucleinsäuren“, Körper, die zwar hinsichtlich ihrer Zusammensetzung bei den einzelnen Nucleoproteiden Verschiedenheiten aufweisen, für welche aber der Umstand charakteristisch bleibt, daß sie beim Erhitzen mit gewissen Mineralsäuren als Produkte der Hydrolyse neben Phosphorsäure einen oder mehrere Purin-Abkömmlinge, die bekannten „Xanthinbasen“, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Xanthin, häufig auch ein Pyrimidinderivat, das Thymin, $C_5H_6N_2O_2$*) abspalten.

Kossel, dessen vorzüglichen Forschungen wir zum größten Teil unsere Kenntnisse von den Nucleinsäuren verdanken, hat seiner Zeit im Hinblick auf die großen quantitativen Unterschiede im Gehalt der verschiedenen Nucleinsäuren an Xanthinbasen darauf hingewiesen, daß sich möglicherweise vier Nucleinsäuren unterscheiden lassen, von denen jede nur eine einzige Purinbase liefert. Diese Vorstellung Kossels schien eine wichtige Stütze zu erhalten durch Ivar Bangs Entdeckung**) der Guanylsäure, einer Nucleinsäure, die man durch die Einwirkung von Alkalilauge auf die Nucleoproteide des Pankreas erhält und welche, wie der Name andeutet, bei der Hydrolyse nur eine Purinbase liefert, nämlich Guanin.

---

*) Walter Jones, Zeitschr. f. physiol. Chemie. **29**, 26 (1900). H. Steudel, „Die Konstitution des Thymins“. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **32**, 285 (1901).

) Ivar Bang, „Die Guanylsäure der Pankreasdrüse und deren Spaltungsprodukte“. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **36, 133 (1898).

Erweist sich diese Vorstellung, die nicht durchweg mit den bekannten Tatsachen (Schmiedeberg, Levene, Walter Jones und G. H. Whipple, T. B. Osborne*) im Einklang steht, als richtig, so muß angenommen werden, daß an dem Aufbau verschiedener Nucleoproteide mehrere Nucleinsäuren beteiligt sind; denn es besteht kein Zweifel, daß ein Teil der untersuchten Nucleoproteide bei der Hydrolyse mehr als eine Purinbase liefert.

Hammarsten, dessen Untersuchungen der Nucleoproteide und ihres Verhältnisses zu den Nucleinen wir viel von unserer Kenntnis dieser Körper verdanken, möchte die Bezeichnung „Nucleine" auf die Eiweißverbindungen der Nucleinsäuren beschränkt sehen, welche nach längerer Digestion mit Pepsin und Salzsäure ungelöst bleiben. Uns erscheint jedoch diese Beschränkung unerwünscht und nicht ganz folgerichtig, und wir halten dafür, daß der Ausdruck Nuclein, den wir aus Gründen der Bequemlichkeit, der Geschichte und der Anschaulichkeit beizubehalten empfehlen, zur Bezeichnung aller primären Spaltungsprodukte dienen soll, welche durch einfache Hydrolyse hervorgehen aus der höher zusammengesetzten Muttersubstanz, dem nativen Nucleoproteid. In diesem Sinne wird der Ausdruck Nuclein in dieser Arbeit gebraucht werden, wobei es selbstverständlich erscheint, daß jedes „Nuclein" zugleich als „Nucleoproteid" zu betrachten ist, falls es die Verbindung eines Eiweißkörpers mit einer oder mehreren Nucleinsäuren darstellt.

Über Hammarstens Untersuchungen der Nucleoproteide des Pankreas.

In einer höchst interessanten und reichhaltigen Arbeit aus dem Jahre 1894 gab Hammarsten**) einen Bericht über zwei Nucleoproteide, die er aus dem Pankreas dargestellt hatte.

Den ersten dieser Körper nannte er „α-Proteid". Er fand diesen Körper, der sich in Wasser löst, im kalten wässerigen Pankreas-Extrakte und beobachtete, daß er daraus durch Essigsäure gefällt wird und daß seine Lösungen beim Kochen gerinnen, wobei eine neue Substanz, das β-Nucleoproteid in Lösung bleibt.

---

*) O. Schmiedeberg, Archiv f. experiment. Path. und Pharmak. **43**, 57 (1899). P. A. Levene, Zeitschr. f. physiol. Chemie, **32**, 541 (1901). Walter Jones & G. H. Whipple, American Journal of Physiology, **7**, 423 (Sept. 1, 1902). T. B. Osborne & Isaak E. Harris, Zeitschr. f. physiol. Chemie. **36**, 85 (Sept. 1902).

) Olaf Hammarsten, „Zur Kenntnis der Nucleoproteide", Zeitschr. f. physiol. Chemie **19, 19 (1893).

Obschon Hammarsten vollkommen erkannte, daß der ursprüngliche, der α-Körper, die Muttersubstanz darstellt, während das β-Proteid nur als Zersetzungsprodukt zu betrachten ist, widmete er letzterem vorwiegend seine Aufmerksamkeit. Einmal handelte es sich ihm damals um das Studium der nicht Eiweißnatur aufweisenden Abkömmlinge des Pankreas-Nucleoproteids, und so erschien es zweckmäßig als Ausgangsmaterial ein solches zu wählen, das weniger Eiweiß enthielt. Der Hauptgrund aber, weswegen er das interessante α-Nucleoproteid vorläufig nicht weiter verfolgte, lag in der großen Schwierigkeit, es in genügender Menge rein zu gewinnen, denn der Versuch der Reindarstellung führte zu einer allzu geringen Ausbeute.

Hammarsten gibt an, daß eine der am schwersten zu beseitigenden Verunreinigungen der Blutfarbstoff sei, daneben ein anderer Farbstoff, dessen Entstehung er dem Einfluß der Luft auf das Nucleoproteid selbst zuschreibt. Eine weitere dem Nucleoproteid anhaftende Verunreinigung fand Hammarsten im Trypsin, dessen Abtrennung ihm nicht gelang. Er fand das proteolytische Vermögen der Substanz so kräftig, daß er auf keine andere Weise gleich wirksames Trypsin gewinnen konnte.

Den β-Körper gewann Hammarsten nicht durch Zersetzung der isolierten Muttersubstanz, sondern auf folgende Weise: Fein zerteiltes, vollkommen frisches Rinds-Pankreas wurde in Wasser gekocht und dem ganz klaren leicht gelblichen Filtrat nach der Abkühlung Salzsäure (1 bis 2 Teile) oder Essigsäure (5 bis 10 Teile auf 100 Teile Flüssigkeit) hinzugefügt. Den erhaltenen reichlichen, weißen, flockigen Niederschlag löste er mit Hilfe von möglichst wenig Alkali in Wasser und fällte nochmals durch Säure im Überschuß. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Verfahrens wurde der ursprünglich gefällte Körper möglichst gereinigt.

Es muß ausdrücklich betont werden — und Hammarsten selbst tut dies —, daß das sogenannte β-Nucleoproteid nicht einen vorgebildeten Bestandteil des Pankreas darstellt, sondern ein „Nuclein“ ist, hervorgegangen unter dem Einfluß des siedenden Wassers aus dem nativen „Nucleoproteid (bezw. vielleicht aus mehreren Nucleoproteiden).

Wir glauben nicht der Autorität des bedeutenden schwedischen Chemikers nahe zu treten, wenn wir der Bemerkung Raum geben, daß es uns zum erfolgreichen Studium eines Nucleins vorteilhafter schien, als Ausgangspunkt die reine Muttersubstanz zu wählen, als das in Form von tierischem Gewebe vorliegende Rohmaterial. Hammarstens β-Nucleoproteid läßt sich eben nur als ein „Nuclein“ oder als „Nucleingemisch“ auffassen, das durch die Wirkung kochenden Wassers auf die im Gewebe des Pankreas präformierten Nucleoproteide entsteht.

Ungeachtet dieses Einwands, müssen wir die bemerkenswerten, interessanten Tatsachen hervorheben, welche Hammarsten im Laufe der besprochenen Untersuchungen aufgefunden hat. Er hat eine Reihe Elementar-Analysen verschiedener Präparate dieses Nucleins ausgeführt und gezeigt, daß es beim Kochen mit Trommerscher Lösung direkt keine Reduktion gibt, wohl aber nach Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure. Obwohl es unmöglich war, die reducierende Substanz im reinen Zustand darzustellen, gelang es ihm, ein Osazon mit konstantem Schmelzpunkt zu gewinnen, dessen Merkmale mit denen des Osazons einer Pentose übereinstimmen, eine Beobachtung, welche völlig mit den Untersuchungen Kossels und Bangs und anderer über die Gegenwart eines Kohlehydrat-Kerns in den Nucleinsäuren im Einklang steht. Ferner hat Hammarsten gezeigt, daß sein Nuclein bei Erhitzen mit 2-proz. Schwefelsäure auf dem Wasserbade Guanin abspaltete. Auf Hammarstens Anregung hat später Ivar Bang die Untersuchung fortgesetzt, aus Hammarstens Nuclein die Nucleinsäure dargestellt und als Guanylsäure bezeichnet.

II. Experimenteller Teil.

1. Über das Pankreas-Nucleoproteid und über die von ihm sich ableitenden Nucleine.

A. Das Nucleoproteid.

Darstellungsweise.

Gut zerkleinertes Schweinspankreas wurde succesive mit 50-proz. Alkohol, 75-proz. Alkohol und 95-proz. Alkohol und schließlich behufs Entwässerung mit Alkohol und Äther behandelt. Das so erhaltene Material wurde wiederholt mit einer 5-proz. Lösung von Ammoniumacetat extrahiert, die gesamte Extraktionsflüssigkeit klar filtriert und in das vierfache Volumen schwachen Alkohols gegossen. Der so gewonnene Niederschlag wurde durch Dekantierung mit einer grossen Menge verdünnten Alkohols gewaschen und schließlich mit absolutem Alkohol und Äther getrocknet. Der Zweck dieser Manipulationen war: die Entfernung des Farbstoffs der Drüse, da sich dieser in verdünntem Alkohol etwas, mehr noch in alkoholischer Ammoniumacetatlösung, aber auch, wenn auch nur in sehr geringem Grade, in einer wässerigen Solution von Ammoniumacetat löst. Durch diese Manipulationen werden zugleich große Mengen anorganischer Salze entfernt, und die gerinnbaren Eiweißsubstanzen werden unlöslich.

Eine 2-proz. wässerige Lösung dieses Rohprodukts war nur blaßgelb gefärbt und konnte selbst in einer 220 mm langen Röhre und bei Anwendung von monochromatischem Natrium-Licht ohne Schwierigkeit polarimetrisch untersucht werden. Als Polarimeter diente ein „Halbschatten-Polarimeter“ nach Laurentschem Modell, von Schmidt und Haensch in Berlin. Die Untersuchung ergab, daß die Lösung eine rechtsdrehende Substanz enthielt. Die Lösung ließ keine Spur einer Reduktion erkennen, selbst nicht nach längerem Kochen mit Fehlingscher Lösung. Sie enthielt reichlich eine Substanz, welche bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure Xanthinbasen abspaltete.

Die Hauptportion der Drüsensubstanz wurde, nach Reinigung in oben geschilderter Weise, mit 20 Teilen Wasser behandelt und die filtrierte Lösung tropfenweise mit Essigsäure versetzt. Als der Säuregehalt der

Flüssigkeit 1 Proz. betrug, fiel ein Niederschlag in scharf begrenzten weißen Flocken aus. Der Niederschlag wurde abcentrifugiert, in Wasser aufgenommen und, während die Reaktion der Flüssigkeit beständig mit Lackmus geprüft wurde, mit einer überaus verdünnten Ammoniaklösung tropfenweise versetzt. Eine sehr geringe Menge Alkali genügte, um die anhaftende Essigsäure zu neutralisieren: die Lösung wurde neutral und blieb es auch bis etwa doppelt so viel Ammoniak verwendet worden war, als zur vollständigen Lösung des Nucleoproteids genügt hätte. Augenscheinlich ist das Nucleoproteid mindestens eine zweibasische Säure, deren saures Ammonsalz wasserlöslich ist und sich gegen Lackmus neutral verhält.

Das Nucleoproteid wurde durch abwechselndes Lösen in Ammoniak und Fällen mit sehr geringen Mengen Essigsäure gereinigt. Die zuletzt erhaltene Lösung wurde zur 5 fachen Menge 95-proz. Alkohol gegossen, wiederholt durch Dekantieren mit sehr großen Mengen 95-proz. Alkohol und Äther gewaschen und dann in einem Exsiccator über Schwefelsäure aufbewahrt.

Optisches Verhalten.

1. Eine gewogene Menge des Nucleoproteids wurde mit Wasser, nach Zufügung einer Spur Ammoniak, aufgenommen. Die Lösung wurde mit Wasser bis zu einem bestimmten Volumen aufgefüllt und polarimetrisch untersucht.

Gewicht der Substanz (W)	1.006 g
Volumen der Lösung (V)	25 ccm
Abgelesener Ablenkungswinkel (α) . .	$+ 3^0 4'$
Länge der Röhre (l)	200 mm

$$(\alpha)_D = \frac{\alpha \, . \, V}{l \, . \, W} = +38{,}1^0$$

2. Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch die Prüfung eines anderen Nucleoproteid-Präparates.

Gewicht der Substanz	0.500 g
Volum der Lösung	25 ccm
Abgelesener Ablenkungswinkel	$+ 1^0 30'$
Länge der Röhre	200 mm

$$(\alpha)_D = \frac{\alpha \, . \, V}{l \, . \, W} = +37{,}5^0$$

Als die Lösung mit Essigsäure im Überschusse versetzt und der Niederschlag abfiltriert worden, erwies sich das Filtrat als inaktiv.

B. Das neben dem Nucleoproteid vorhandene, vermutlich aus ihm hervorgegangene Nuclein und die „Restsubstanz“.

Darstellung. Der wässerige Auszug der gereinigten Drüsensubstanz (siehe oben), aus welchem durch Zusatz von Essigsäure bis zu 1 Proz. das Nucleoproteid abgeschieden worden war, wurde neuerdings

tropfenweise mit 20-proz. Essigsäure versetzt. Bis zu 2 Proz. Säuregehalt war nicht der geringste Niederschlag zu bemerken. Bei weiterem Zusatz trat jedoch Trübung auf, und bei einem Säuregehalt von 5—6 Proz. schied sich ein wohlbegrenzter, flockiger Niederschlag aus. Dieser Niederschlag, den wir Nuclein nennen wollen, wurde abcentrifugiert und mit Hülfe der Centrifuge, unter großem Materialverluste, zweimal mit Wasser gewaschen. Das Produkt wurde in Wasser verteilt und durch sehr vorsichtigen Zusatz von Ammoniak in Lösung gebracht. Als das Nuclein vollständig gelöst war, reagierte die Flüssigkeit auf Lackmus noch sauer. Diese Lösung wurde in das 4 fache Volumen 95-proz. Alkohol gegossen; das ausgefallene Nuclein wurde gewaschen, und nach der oben für das Nucleoproteid beschriebenen Methode getrocknet.

Die Flüssigkeit, aus der das „Nuclein" ausgefällt worden war, wurde nun zur 4 fachen Menge Alkohol gegossen, der dabei erhaltene Niederschlag gewaschen und durch Alkohol und Äther entwässert. Dieses Präparat, welches natürlich sehr unrein, besonders reich an anorganischen Salzen war, werden wir später als „Restsubstanz" beschreiben.

In der beschriebenen Weise haben wir durch fraktionierte Fällung mit Essigsäure, bei Gegenwart anorganischer Salze, drei Präparate erhalten:

1. Das Nucleoproteid, welches zweifellos mit dem von Hammarsten als α-Proteid bezeichneten Körper identisch ist: nahezu unlöslich in reinem Wasser, aber löslich in der geringsten Menge von Ammoniak und Natronlauge.

2. Der Körper, den wir Nuclein genannt haben, um unsere Ansicht über seine Verwandtschaft mit der ersten Substanz zu kennzeichnen; derselbe ist in Wasser sehr leicht löslich.

3. Die „Restsubstanz".

Zusatz einer Spur Kupfersulfat färbt die Lösung des Nucleoproteids in Natronlauge schön rosa; aber man gewahrt keinen Schimmer von Violett, ehe nicht eine verhältnismäßig große Menge Kupferlösung zugefügt worden ist, eine Reaktion, welche der „Biuret-Reaktion" der Proteosen sehr ähnelt. Das „Nuclein" gibt bei ähnlicher Behandlung nur eine ganz schwache Rosafarbe und das Violett erscheint schon bei ganz geringem Kupferzusatz, während die „Restsubstanz" von Anfang an eine violette Färbung gibt.

Der eine von uns hat kürzlich gezeigt, daß das Nucleoproteid des Pankreas, wie es im wesentlichen nach der für die oben beschriebenen Präparate angewandten Methode erhalten wird, bei der Hydrolyse zwei Xanthinbasen liefert; nämlich Guanin und Adenin und zwar in einem Verhältnis, das nahe 4 Äquivalenten des ersteren zu einem Äquivalent des letzteren entspricht. Das „Nuclein" und die „Restsubstanz" geben gleichfalls bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure Xanthinbasen. Alle drei Präparate sind phoshorhaltig; alle werden aus wässerigen oder schwach alkalischen Lösungen

durch Zusatz einer Spur Salzsäure vollständig gefällt und alle geben beim Kochen ihrer neutralen Lösungen Niederschläge.

Optisches Verhalten des Nucleins.

Bevor sich uns die Gelegenheit zu einer optischen Untersuchung des Nucleoproteids bot, haben wir uns durch folgende Beobachtung davon überzeugt, daß das spezifische Drehungsvermögen der Substanz, die wir als Nuclein bezeichnen, höher sein muß als das des Nucleoproteids.

Eine vollkommen neutrale und klar filtrierte Lösung des Nucleoproteids, hergestellt durch Behandlung eines Teiles der Substanz mit Wasser und einer zur Erzielung vollständiger Lösung unzureichenden Menge Ammoniak, zeigte im 200 mm Rohr eine Drehung um 1° 46′. Die Lösung wurde zum Kochen erhitzt und das geronnene Eiweiß abfiltriert. Die Polarisation des Filtrats im 200 mm langen Rohr ergab eine Drehung von 1° 49′. Wir wissen nun, daß das Kochen einen Teil des eiweißhaltigen Materials, welches vorher einen Bestandteil des Nucleoproteid-Komplexes bildete, in ein Nuclein umwandelt. Da der Drehungswinkel in unserem Experiment bei gleicher Rohrlänge konstant blieb, so kann aus der durch die Koagulation bedingten Abnahme an gelöster Substanz nur auf eine Zunahme des spezifischen Drehungs-Vermögens geschlossen werden.

Es wurde ferner die direkte Bestimmung des spezifischen Drehungs-Vermögens des Nucleins vorgenommen. Der Körper war in Wasser gelöst, und da die Flüssigkeit noch einen Stich Farbe hatte, wurde sie in einem kürzeren Rohre, als wir sonst benutzten, geprüft.

Gewicht der Substanz	1.009 g
Volum der Lösung	50 ccm
Abgelesener Ablenkungswinkel . . .	+ 1° 18′
Länge des Rohres	100 mm

$$(\alpha)_D = \frac{\alpha \cdot V}{l \cdot W} = +64{,}4^\circ$$

Die Lösung wurde mit Salzsäure behandelt, um das Nuclein auszufällen, und die filtrierte Flüssigkeit in einem 200 mm Rohr geprüft. Die Lösung war schwach linksdrehend (—0° 9′). Zur Erklärung dieser Beobachtung müssen wir bemerken, daß wir mehrmals sehr schwach linksdrehende Filtrate erhielten, wenn Salzsäure zum Fällen des Proteids verwendet, besonders wenn die saure Flüssigkeit in Kontakt mit dem Niederschlag gelassen worden war. Vermutlich ist die negative Drehung einem dabei

entstehenden in verdünnter Salzsäure löslichen linksdrehenden Eiweißkörper zuzuschreiben. Wie das Nucleoproteid, gibt auch das Nuclein beim Kochen der Lösung ein Gerinnsel, ohne daß sich die Drehung der Lösung merklich ändert. Dieser Umstand deutet auf die Gegenwart eines Nucleins hin, dessen spezifisches Drehungs-Vermögen größer ist als 64,4°. Es läßt sich leicht nachweisen, daß eine derartige Substanz im Präparat vorhanden ist. Wir haben sie oben als „Restsubstanz" bezeichnet.

Eine abgewogene Menge dieser Substanz wurde in einem abgemessenen Volum Wasser gelöst. Die Lösung wurde polarimetrisch untersucht, mit Salzsäure behandelt und die Menge der ins Filtrat übergehenden optisch inaktiven Substanz ermittelt.

Es wurden folgende Zahlen erhalten:

Gewicht der verwendeten Substanz	0,520 g
Gewicht der optisch inaktiven Substanz . . .	0,269 „
Gewicht der optisch aktiven Substanz	0,251 „
Volum der Lösung	25 ccm
Abgelesener Ablenkungswinkel	+ 1° 38′
Länge des Rohres	200 mm

$$(\alpha)_D = \frac{a \cdot V}{l \cdot W} = +81{,}1^\circ$$

C. Hammarstens Präparat.

Wie wir bereits ausgeführt haben, muß Hammarstens β-Nucleoproteid, welches aus dem Pankreas durch Kochen der fein zerteilten Drüse mit Wasser gewonnen wurde, ipso facto ein Nuclein sein. Die von uns erhaltenen Ergebnisse legten den Wunsch sehr nahe, auch diese Substanz einer optischen Prüfung zu unterziehen. Unter geringfügiger Abweichung*) von Hammarstens Vorgang (die sich als absolut notwendig erwies, um den Farbstoff zu entfernen, aber unmöglich die chemische Natur des Produktes beeinflussen konnte) gelang es uns, ein Nuclein darzustellen, welches mit Hammarstens Präparat (β-Nucleoproteid) identisch sein mußte. Die Substanz, welche wir erhielten, war wasserlöslich und gab eine violette Biuret-Reaktion. Ihre Lösung war verhältnismäßig stark gefärbt, besaß aber ein so großes Drehungsvermögen, daß sich ziemlich befriedigende polari-

*) Wir benutzten Ammoniak zur nochmaligen Lösung des Nucleins anstatt eines fixen Alkali, wie dies Hammarsten tat. Auch haben wir zuletzt eine wässerige Lösung von Nuclein in 95-proz. Alkohol gegossen und mittels Dekantierens gewaschen, anstatt zu filtrieren.

metrische Beobachtungen, auch mit stark verdünnten Lösungen, anstellen liessen. Die Substanz drehte rechts.

Folgende Zahlen wurden erhalten:

Gewicht der Substanz	0.200 g
Volum der Lösung	25 ccm
Abgelesener Ablenkungswinkel (Mittel aus 8 Ablesungen)	0° 47′
Länge des Rohres	100 mm

$$(\alpha)_D = \frac{a \,.\, V}{l \,.\, W} = +97{,}9^0$$

2. Über das Nucleohiston der Thymusdrüse.

Auf den ersten Blick scheint es ein Leichtes, diese Substanz in beliebiger Menge nach dem sehr einfachen Verfahren herzustellen, das Lilienfeld in zwanzig Zeilen beschreibt*).

Diese Methode führt jedoch zu einem Produkt, dessen Lösungen so stark opalescent sind, daß an eine optische Prüfung nicht gedacht werden kann. Die Trübung ist so beständig, daß wir eine Zeit lang zu der Ansicht neigten, sie sei eine der Substanz angehörige Eigenschaft. Schließlich erhielten wir jedoch Lösungen nahezu von der Farblosigkeit und Durchsichtigkeit destillierten Wassers. Es ist nur notwendig, Lilienfelds Präparat mit einer 5-proz. Lösung von Ammonacetat auszuziehen und zu filtrieren. Die Flüssigkeit filtriert sehr langsam, aber ganz klar und ohne Unterbrechung. Die Lösung wurde in 95-proz. Alkohol gegossen, das ausgefallene Proteid gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet, wie wir es bei den anderen Präparaten beschrieben haben. Die so erhaltene Substanz wurde polarimetrisch in einer Lösung untersucht, die mittels stark verdünnten Ammoniaks hergestellt war.

Folgende Zahlen wurden erhalten:

Gewicht der Substanz	2.023 g
Volumen der Lösung	50 ccm
Abgelesener Ablenkungswinkel . . .	+ 3° 20′
Länge des Rohres	220 mm

$$(\alpha)_D = \frac{a \,.\, V}{l \,.\, W} = +37{,}5^0$$

3. Über das Nucleoproteid der Nebenniere.

In einer in Gemeinschaft mit G. H. Whipple vorgenommenen Untersuchung beschrieb vor kurzem der eine**) von uns das

*) Leon Lilienfeld, „Zur Chemie der Leukocyten“. Zeitschr. f. physiol. Chemie 18, 473 (1894).

**) Walter Jones und G. H. Whipple, „The Nucleoproteid of the Suprarenal Gland“, American Journal of Physiology. 7, 423 (Sept. 1, 1902).

Nucleoproteid der Nebenniere und konnte konstatieren, daß dieser Körper ein Thymonucleoproteid ist. Spätere Analysen erwiesen die Identität der Nucleoproteide der Nebenniere vom Ochsen und vom Schaf. Sie weichen in ihrer chemischen Zusammensetzung kaum vom Nucleoproteid des Pankreas ab, wie es im wesentlichen nach oben beschriebener Methode erhalten wird.

In nachstehender Tabelle sind die Ergebnisse der Analysen dieser Körper zusammengestellt. Vergleichshalber sind auch die von Hammarsten an seinem Präparate gewonnenen Analysenwerte eingereiht.

	Nucleoproteid der Nebenniere vom Schaf	Nucleoproteid der Nebenniere vom Ochsen	Nucleoproteid des Pankreas vom Schwein	Hammarstens Präparat
C	46,22 Proz.	46,81 Proz.	45,83 Proz.	43,62 Proz.
H	6,10 „	6,38 „	6,26 „	5,45 „
P	4,70 „	4,72 „	5,05 „	4,48 „
N	17,92 „	17,85 „	17,42 „	17,39 „

Soweit die verfügbaren Beobachtungen ein Urteil gestatten, liefern die Nucleoproteide des Pankreas und der Nebenniere Guanin und Adenin im gleichen relativen Verhältnis, so daß es scheint, daß ein Molekül einer Nucleinsäure oder eines Nucleoproteids zwei verschiedene Xanthinbasen liefern kann.

Bekanntlich bildet der charakteristische, physiologisch aktive Bestandteil der Nebennieren, wenn er in wässeriger Lösung der oxydierenden Wirkung der Luft ausgesetzt wird, ein dunkelbraunes Pigment. Daher sind wässerige Auszüge des Organs immer stark gefärbt und bieten bei der optischen Prüfung große Schwierigkeiten. Ist infolgedessen auch das Arbeiten mit dem Nucleoproteid der Nebenniere weniger befriedigend, als man wünschen möchte, so kann doch ganz sicher festgestellt werden, daß auch dieses Nucleoproteid rechts dreht.

Die Methode der Isolierung, welche wir benutzt haben, weicht nicht wesentlich von dem oben beschriebenen Verfahren ab; nur wurde das Organ mehrmals mit Essigsäure ausgezogen, bevor das Nucleoproteid entfernt worden war. Inbetreff der näheren Beschreibung verweisen wir auf die oben citierte Arbeit. Wir erhielten schließlich eine Substanz, die zwar für eine genaue, polarimetrische Bestimmung noch zu stark gefärbt war, aber doch in verdünnter Lösung leicht als rechtsdrehend erkannt werden konnte.

Wir erhielten folgende Zahlen:

Gewicht der Substanz	0,199 g
Volum der Lösung	25 ccm
Abgelesener Ablenkungswinkel . . .	0° 23′
Länge des Rohres	100 mm

$$(a)_D = + 48{,}1^\circ$$

Dieser Wert bedarf vielleicht einer Nachprüfung, kommt aber zweifellos der Wahrheit nahe.

III. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Bevor wir die Schlußfolgerungen ziehen, zu welchen nach unserem Dafürhalten, die in dieser Arbeit vorgeführten Untersuchungen berechtigen, möchten wir das Ergebnis derselben kurz zusammenfassen:

Wir haben sechs Nuclein-Substanzen aus verschiedenen Drüsen dargestellt und haben Methoden angegeben, mit Hilfe deren mehrere derselben isoliert und genügend frei von Farbstoff erhalten werden können, um eine exakte polarimetrische Bestimmung zu gestatten. Alle diese sechs Substanzen liefern bei der Hydrolyse Eiweißkörper, Phosphorsäure und Purin-Abkömmlinge, und alle enthalten Eisen in fester Verbindung; sie sind daher sämtlich Nucleoproteide, im weitesten Sinne des Wortes.

Die Darstellungs-Methoden waren so gewählt, daß alle bekannten rechtsdrehenden Substanzen, welche sonst im Organismus vorkommen, ausgeschlossen blieben. Bei allen Präparaten wurde ferner die Abwesenheit von Substanzen konstatiert, welche Fehlingsche Lösung rasch oder langsam reduzieren. Trotzdem erwiesen sich alle diese Substanzen als rechtsdrehend. Das gegefundene spezifische Drehungsvermögen variierte für Licht von der Wellenlänge D, von $+37{,}5^{0}$ (Nucleohiston der Thymusdrüse) bis zu $+97{,}9^{0}$ (Hammarstens β-Nucleoproteid des Pankreas).

Die beobachteten Tatsachen berechtigen zu nachstehenden Schlußfolgerungen:

1. Die Nucleoproteide (im weiteren Sinne des Wortes, d. h. einschließlich der Verbindungen der Nucleinsäuren mit Eiweiß-Substanzen), welche im Pankreas, in der Thymus und in der Nebenniere enthalten sind, sind rechtsdrehende Eiweiß-Verbindungen.

2. Wenn ein Nucleoproteid durch Abspaltung von Eiweiß-Molekülen in ein Nucleoproteid des „Nuclein"-Typus übergeführt wird, so nimmt sein spezifisches Drehungsvermögen zu.

3. Folgerichtig läßt sich erwarten, dass nicht nur die wohlcharakterisierten und typischen Nucleoproteide, die den Gegenstand unserer Untersuchungen gebildet haben, sondern überhaupt alle Nucleoproteide, einschließlich der sogenannten Nucleine, eine Gruppe rechtsdrehender Substanzen bilden.

Nachträgliche Bemerkung.

Erst kürzlich ist es dem einen von uns zur Kenntnis gelangt, daß weiland Prof. Alexander Schmidt*) in Dorpat in seinen Untersuchungen über die Gerinnung des Blutes die Tatsache hervorgehoben hat, es sei unter den löslichen Bestandteilen des Protoplasmas ein Körper vorhanden — er bezeichnet ihn als „Cytoglobin" — der sich als rechtsdrehend erweist. Soviel wir wissen, ist diese Beobachtung A. Schmidts nie beachtet oder zitiert worden: weder in den Lehrbüchern der physiologischen Chemie, noch von den Forschern auf dem Gebiete der Chemie des Blutes. Es ist nach dem Mitgeteilten keine Frage, daß Schmidts Cytoglobin aus einem sehr unreinen Gemenge von Nucleoproteiden bestand; es geht dies schon daraus hervor, daß seine Substanz 12,52 Proz. Asche und 56,36 Proz. Kohlenstoff enthielt (gegenüber 45,83 Proz. im Pankreas-Nucleoproteid). Allein es bleibt die Tatsache bestehen, daß bereits dieser unermüdliche Forscher die Rechtsdrehung, wenn auch nicht eines bestimmten einheitlichen Nucleoproteids, so doch eines Gemenges von Nucleoproteiden, seines „Cytoglobins", richtig beobachtet hat.

4. März 1903. A. G.

---

*) Alexander Schmidt „Zur Blutlehre", Leipzig, Verlag v. F. C. W. Vogel 1892. Siehe das Kapitel „Über den in Wasser löslichen Bestandteil des Protoplasmas u. s. w." (S. 127—142). Alexander Schmidt „Weitere Beiträge zur Blutlehre" (nach des Verfassers Tode herausgegeben). Wiesbaden, J. F. Bergmann 1895, speziell das Kapitel „Zur Kenntnis des Protoplasmas und seiner Derivate" (S. 201—249).

III.

Beiträge zur vergleichenden Physiologie des Hungerstoffwechsels.

Erste Mitteilung: Der Hungerstoffwechsel der Insekten.

Von Dr. med. **B. Slowtzoff.**

Im Laufe ihrer Entwickelung haben Tiere und Pflanzen mannigfache Vorrichtungen erworben, die ihnen den Kampf ums Dasein erleichtern. Zum Schutz gegen das Eindringen von Fremdkörpern und Mikroorganismen und gegen die Einwirkung äußerer Reize besteht ein ausgebildetes Verteidigungs-System, wie wir es z. B. bei der Entzündung beobachten können. Die Untersuchungen Metschnikoffs*) und seiner Schüler haben gezeigt, daß dabei neben anderem die Wanderzellen mesodermalen Ursprungs eine große Rolle spielen. Gegen schädliche Temperaturschwankungen des Mediums sind die höheren Tiere durch Vorrichtungen geschützt, die imstande sind, die Temperatur des Körpers innerhalb gewisser konstanter Grenzen zu erhalten. Andererseits haben gewisse niedrige einzellige Mikroorganismen eine Beschaffenheit des Zellprotoplasmas erworben, der zufolge die Eiweißkörper desselben selbst bei 50—60° C. nicht koagulieren.

Auch gegen den schädlichen Einfluß der Nahrungs-Entziehung haben sich verschiedene Schutzvorrichtungen ausgebildet. Die einzelligen, sowie auch bestimmte höhere Organismen können unter ungünstigen Verhältnissen in einen scheintodähnlichen Zustand verfallen, bei welchem der Stoffwechsel auf ein Minimum heruntersinkt. Die höheren Tiere können aber in den meisten Fällen dem Hunger ziemlich lange auf Kosten aufgespeicherter Reservestoffe, deren Menge bis auf 45 Proz. des Gesamtgewichtes steigen kann, widerstehen.

Bei der Untersuchung des Hungerstoffwechsels ist bisher das vergleichend physiologische Studium sehr wenig benutzt worden. Die meisten Autoren hielten sich nur an die höheren Wirbeltiere. Eine vergleichend physiologische Bearbeitung dürfte aber hier wie auch sonst bei der Behandlung wichtiger biologischer Probleme

---

*) Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. 1892. Paris.

von großer Bedeutung sein, da sie den Gesichtskreis erweitert und vor Einseitigkeit schützt.

Es schien mir deshalb von Wert, die Erscheinungen des Hungerstoffwechsels an niederen wirbellosen Tieren näher zu studieren. Meine ersten Versuche, deren Resultate ich hier mitteilen möchte, habe ich an Maikäfern angestellt. Im allgemeinen bieten die Insekten manche Eigentümlichkeiten der chemischen Zusammensetzung, die näher zu untersuchen Interesse versprach.

Wegen der Kleinheit der einzelnen Individuen mußten die Versuche stets an einer größeren Zahl von Tieren durchgeführt werden, was zugleich die großen individuellen Schwankungen beseitigt. Die Hauptmasse der Maikäfer war Ende April 1902 in der Umgebung von Heidelberg gesammelt; durch 24 Stunden vor Anfang des Versuches wurden die Tiere in einem großen mit Laub gefüllten Holzkasten aufbewahrt, so daß die meisten ganz gut gefüttert waren. Am Morgen des ersten Versuchstages wurde ein Teil davon gewogen, durch Spiritusdämpfe getötet, zermahlen und in 95-proz. Alkohol gebracht. Die zweite Hälfte wurde in drei Gruppen geteilt, deren Gewicht während der nun folgenden Hungerperiode täglich ermittelt wurde. Jeden Tag wurden die Maikäfer in ein frisches Glas gebracht. Die Käfer, die während des Versuches zu grunde gingen, wurden herausgenommen und gewogen; ihr Gewicht wurde zu dem Gewicht der überlebenden der gleichen Gruppe hinzuaddiert.

Die nachstehenden drei Tabellen (I—III) geben die Verhältnisse des Gesamtgewichts der einzelnen Gruppen wieder. Die Kurve der Gewichtsabnahme während des Hungerns entspricht daher Mittelwerten. In einem besonderen Versuche (Tab. IV) habe ich die Gewichte von vier einzelnen hungernden Käfern jeden Tag auf das mg genau bestimmt. Die Kurven stimmen im allgemeinen mit den Kurven der Mittelwerte in Tab. I—III überein.

Tabelle I.

Tag und Datum des Versuchs	Dauer des Hungerns in Tagen	Gewicht der (60) Maikäfer	Absoluter Gewichtsverlust in g	Gewichtsverlust in Proz.	Täglicher Gewichtsverlust in Proz.	Mittlerer täglicher Gewichtsverlust in Proz.
24. IV.	0	66,20	—	—	—	
25. IV.	1	64,65	1,55	2,34	2,34	
26. IV.	2	63,65	2,55	3,85	1,51	
27. IV.	3	62,65	3,55	5,26	1,41	2,17
28. IV.	4	61,00	5,20	7,85	2,59	
29. IV.	5	59,00	7,20	10,87	3,02	
1. V.	7	57,50	8,70	13,14	1,13	
3. V.	9	55,70	10,50	15,86	1,36	
5. V.	11	54,50	11,70	17,68	0,91	1,17
7. V.	13	52,90	13,30	20,09	1,20	
9. V.	15	51,60	14,60	22,05	0,98	
12. V.	18	50,10	16,10	24,32	0,75	
13. V.	19	48,80	17,40	26,28	1,96	0,88
14. V.	20	48,40	17,80	26,89	0,61	
15. V.	21	48,10	18,10	27,34	0,45	

Tabelle II.

Tag und Datum des Versuchs	Dauer des Hungerns in Tagen	Gewicht der (120) Maikäfer	Absoluter Gewichtsverlust in g	Gewichtsverlust in Proz.	Täglicher Gewichtsverlust in Proz.	Mittlerer täglicher Gewichtsverlust in Proz.
24. IV.	0	108,0	—	—	—	
25. IV.	1	105,0	3,0	2,78	2,78	
26. IV.	2	102,0	6,0	5,56	2,78	
27. IV.	3	101,0	7,0	6,48	0,92	2,04
28. IV.	4	100,0	8,0	7,41	0,93	
29. IV.	5	97,0	11,0	10,19	2,78	
1. V.	7	95,0	13,0	12,04	0,92	
3. V.	9	92,3	15,7	14,54	1,25	
5. V.	11	91,8	16,2	15,00	0,23	0,59
7. V.	13	91,2	16,8	15,55	0,27	
9. V.	15	90,6	17,4	16,11	0,28	
12. V.	18	87,5	20,5	18,98	0,98	
13. V.	19	84,8	23,2	21,48	2,50	
14. V.	20	84,1	23,9	22 13	0,65	1,05
15. V.	21	83,8	24,2	22,40	0,28	

Tabelle III.

Tag und Datum des Versuchs	Dauer des Hungerns in Tagen	Gewicht der (120) Maikäfer	Absoluter Gewichtsverlust in g	Gewichtsverlust in Proz.	Täglicher Gewichtsverlust in Proz.	Mittlerer täglicher Gewichtsverlust in Proz.
24. IV.	0	106,5	—	—	—	
25. IV.	1	104,0	2,5	2,35	2,35	
26. IV.	2	101.0	5,5	5,16	2,81	
27. IV.	3	100,0	6,5	6,10	0,94	3,10
28. IV.	4	93,0	13,5	12,68	6,58	
29. IV.	5	90,0	16,5	15,49	5,42	
1. V.	7	88,0	18,5	17,37	0,94	
3. V.	9	87,8	18,7	17,56	0,09	
5. V.	11	87.2	19.3	18.12	0.28	0,43
7. V.	13	86,9	19,6	18,40	0,14	
9. V.	15	85,5	21,0	19,72	0,36	
12. V.	18	84,2	22,3	20,94	0,41	
13. V.	19	84,0	22.5	21,13	0,19	
14. V.	20	82,0	24.5	23,00	1.87	0,56
15. V.	21	81,9	24,6	23,10	0,10	

Tabelle IV.

Datum und Tag des Versuchs	Dauer des Hungerns in Tagen	Gewicht des Maikäfers Nr. 1	Gewichts-verlust in Proz.	Gewicht des Maikäfers Nr. 2	Gewichts-verlust in Proz.	Gewicht des Maikäfers Nr. 3	Gewichts-verlust in Proz.	Gewicht des Maikäfers Nr. 4	Gewichts-verlust in Proz.	Mittlerer Gewichts-verlust in Proz.	Täglicher Gewichts-verlust in Proz.	Mittlerer täglicher Gewichts-verlust in Proz.
21. IV.	0	1,378	0	0,899	0	1,181	0	0,969	0	—	—	
22. IV.	1	1,367	0,80	0,895	0,44	1,151	2,54	0,930	4,02	1,95	1,95	
23. IV.	2	1,351	1,96	0,856	4,78	1,093	7,45	0,916	5,47	4,91	2,96	1,98
24. IV.	3	1,326	3,77	0,853	5,12	—	(8,60)	—	(7,74)	7,06	2,15	
25. IV.	4	—	(5,88)	—	(6,84)	1,052	10,75	0,872	10,01	8,37	1,31	
26. IV.	5	1,268	7,98	0,802	8,56	—	(12,85)	—	(10,06)	9,86	1,51	
28. IV.	7	—	(8,92)	—	(9,39)	1,026	12,96	0,871	10,11	10,45	0,30	
29. IV.	8	1,242	9,87	0,787	10,23	1,020	13,46	0,856	11,66	11,31	0,86	
30. IV.	9	1,224	11,17	0,776	11,20	1,014	13,97	0,846	12,69	12,26	1,15	
1. V.	10	1,218	11,61	0,764	11,68	—	(14,63)	0,836	13,73	12,91	0,55	
3. V.	11	1,205	12,35	0,752	14,13	—	(14,95)	—	(14,14)	13,89	0,49	
4. V.	13	—	(12,59)	—	(14,69)	0,999	15,24	0,828	14,55	14,27	0,48	
5. V.	14	1,201	12,84	0,742	15,24	0,998	15,33	0,826	14,76	14,54	0,67	
6. V.	15	1,200	12,91	0,740	15,46	0,986	15,50	0,816	15,79	14,92	0,38	
7. V.	16	1,199	12,99	0,737	15,83	—	(16,13)	—	(15,84)	15,19	0,28	0,46
8. V.	17	—	(13,23)	—	(15,87)	0,971	16,77	0,815	15,89	15,44	0,25	
9. V.	18	1,192	13,47	0,736	15,91	0,966	17,07	0,807	16,72	15,79	0,35	
10. V.	19	1,186	13,93	0,730	16,57	0,965	17,27	0,806	16,82	16,15	0,36	
12. V.	21	—	(15,69)	—	(17,82)	0,963	17,44	0,805	16,93	16,97	0,41	
13. V.	22	1,151	16,27	0,715	18,24	—	(17,75)	—	(18,17)	17,61	0,64	
15. V.	23	—	17,21	—	(18,68)	0,958	17,86	0,789	18,58	18,08	0,24	
16. V.	24	1,138	17,42	0,710	18,79	—	(18,18)	—	(19,83)	18,56	0,48	
21. V.	29	—	—	—	—	0,915	21,51	0,704	(27,35)	24,43	0,73	1,17

Bei Vergleich der täglichen Gewichtsverluste bei absoluter Karenz bemerkt man folgendes: In den ersten 5—6 Tagen sind die täglichen Gewichtsverluste ziemlich groß und betragen 3,10 Proz., 2,17 Proz., 2,04 Proz., 1,98 Proz. (im Mittel 2,32 Proz.) des ursprünglichen Körpergewichtes. In der zweiten Hungerperiode gehen die täglichen Gewichtsverluste auf das Minimum herab, sie betragen 0,59, 0,43, 0,46, 1,17 Proz. pro Tag (im Mittel 0,66 Proz.). Vor dem Tode werden die täglichen Gewichtsverluste wieder größer, 1,17, 0,88, 0,56 und 1,10 Proz. (im Mittel 0,93 Proz.). Der Gewichtsverlust in den ersten Hungertagen kommt nicht allein auf Rechnung der Verbrennung von Körpersubstanz und der Wasserverdunstung, sondern auch auf Rechnung der Ausscheidung von Kot. Die prämortale Steigerung des Zerfalls und der damit verbundene größere Gewichtsverlust ist bekanntlich auch bei höheren Tieren festgestellt und wird hier durch die Annahme erklärt, daß in der letzten Lebenszeit an Stelle der sonst vorwiegenden Fettverbrennung Eiweißzerfall tritt.

Die Sterblichkeit der Maikäfer bei absoluter Karenz hängt von dem Ernährungszustande ab. In den meisten Fällen gingen die Insekten am 21. Tage des Hungerns zu Grunde. Von meinen Hunderten von Tieren starben nur vier besonders kräftige Individuen erst nach 28 Tagen. 8 Proz. der gesamten Käferzahl starben am 6. Tag und 16,5 Proz. am 14. Tage.

Während der zweiten Periode des Hungerns, wo die täglichen Gewichtsverluste zum Minimum niedersteigen, bemerkt man manchmal Unregelmäßigkeiten des Gewichtsverlustes. Das hängt, soweit wir die Frage näher untersucht haben, von der Feuchtigkeit und Temperatur der Luft ab*).

Der maximale Gewichtsverlust jener, bei welchem die Maikäfer starben, betrug nach den Wägungen der Gruppen in toto 23,76 Proz. des ursprünglichen Gewichtes.

Man kann aber den Unterschied des Gewichtes vor und nach dem Hungern auch aus dem mittleren Gewicht der Kontrolltiere und Karenztiere ableiten.

Gewicht der Normaltiere:

80	Stück wiegen	71,2 g
120	„ „	108,0 g
120	„ „	106,5 g
20	„ (besonders groß) wiegen	19,0 g
12	„ „ „ „	11,91 g
352	Stück wiegen . . : . . .	316,61 g,

1 Maikäfer (normal) wiegt also im Mittel 0,8997 g.

*) Ich beabsichtige diese Verhältnisse noch näher zu studieren, sobald das mir vorliegende tatsächliche Material größer ist.

Gewicht der Karenztiere:

75	Stück	(6—9.	Tag des Hungerns)	58,2	g
41	„	(10—11.	„ „ „)	26,9	g
54	„	(12—13.	„ „ „)	35,7	g
41	„	(14—15.	„ „ „)	27,0	g
43	„	(15—17.	„ „ „)	28,2	g
23	„	(18.	„ „ „)	14,7	g
29	„	(19—21.	„ „ „)	12,48	g
297	Stück wiegen	. . . . . .		203,18	g,

1 Maikäfer wiegt im Mittel 0,6841 g.

Die mittlere Abnahme des Normalgewichts (0,8997 g) bis zum Hungertod (0,6841 g) macht also 23,99 Proz. des ursprünglichen Gewichtes aus.

Die chemische Untersuchung des gesammelten Materials habe ich in Berlin im Institut für medizinische Diagnostik durchgeführt.

Die in 95-proz. Spiritus konservierten Tiere wurden zermahlen und mit dem Spiritusextrakt auf dem Wasserbade getrocknet. Ein Teil dieser lufttrockenen Masse wurde dann bei 110° C. im Luftbad zu konstantem Gewicht getrocknet. Zur Analyse haben wir teils lufttrockene, teils absolut trockene Substanz benutzt. Das Zerreiben von Chitinstücken erwies sich aber als ziemlich schwierig und selbst nach mehrstündigem Zermahlen war das Pulver nicht ganz homogen, was die vereinzelten Abweichungen der Analysenzahlen erklärt. In den meisten Fällen erwiesen sich die Zahlen der Parallelversuche als gut übereinstimmend, so daß wir deren Richtigkeit annehmen können.

Bei den ersten Vorversuchen haben wir die Menge der Kohlehydrate, der Eiweißkörper, der Fette der Extraktivstoffe und des Chitins bestimmt. Unter Fett verstehe ich dabei das ätherische Extrakt des ganz trockenen Pulvers, das natürlich auch Lecithin und Cholesterin enthält. Nach Ätherextraktion wurde eine bestimmte Menge des Pulvers mit heißem und kaltem Alkohol sowie mit kochendem Wasser ausgezogen. Die Gesamtmenge aller dieser in Lösung übergegangenen Substanzen nenne ich Extraktivstoffe. Der Rest wurde mit 20-proz. Natronlauge behandelt, welche alle mit Alkohol koagulierten Eiweißkörper löst und der ungelöst gebliebene Rest als Chitin gewogen. Der Stickstoffgehalt dieses Chitinrestes stimmte gut mit dem Stickstoffgehalt des Chitins überein, so daß man annehmen kann, daß er in der Tat aus fast reinem Chitin neben Spuren von Pigment bestand. Einigemal habe ich die Bestimmung der Kohlehydrate nach Invertieren des Pulvers mit Salzsäure durchgeführt, ebenso die Bestimmung des Glykogens. Die Zahlen ergaben sich aber als so klein, daß ich sie meinen analytischen Belegen nicht einreihen mochte.

Die Zusammensetzung der Trockensubstanz der Normal- und Karenztiere ergab sich wie folgt:

Tabelle V.

	In 1000 Teilen Trockensubstanz sind enthalten:	
	Normaltiere	Karenztiere
Organische Substanz	939,61	949,12
Anorganische Substanz	60,39	50,88
Chitin und Spuren von Pigment	142,84	169,00
Eiweißkörper	524,29	476,79
Fett, Cholesterin und Lecithin	137,41	23,21
Extraktivstoffe (wasser- u. alkohollöslich)	135,07	271,10

Diese Zahlen können zur Berechnung der Zusammensetzung der frischen Maikäfer dienen. 340 Stück Kontrolltiere wogen frisch 304,3 g, nach dem Trocknen 87,248 g (28,672 Proz. Trockensubstanz). Von den Karenztieren wogen 345 Stück frisch 216,5 g, nach dem Trocknen 75,153 g (34,713 Proz. Trockensubstanz). Hieraus ergibt sich der mittlere Gehalt der frischen Maikäfer an den einzelnen Bestandteilen wie folgt:

Tabelle VI.

	In 1000 Gewichtsteilen frischer Normaltiere	In 1000 Gewichtsteilen frischer Karenztiere
Wasser	713,28	652,87
Trockensubstanz	286,72	347,13
Asche	17,31	17,66
Organische Substanz	269,41	329,47
Chitin	40,96	58,66
Eiweißkörper	150,32	169,60
Fette u. a.	39,40	8,04
Extraktivstoffe	38,73	94,17

Die Zusammensetzung der Maikäfer erleidet sonach beim Hungern beträchtliche Veränderungen. Es kommt zu einem sehr bedeutenden Wasserverlust, so daß die Trockensubstanz der Käfer bis 34,713 Proz. steigt. Der Gehalt an Asche und Eiweißkörpern bleibt konstant; der Gehalt an Fett sinkt von 3,94 Proz. bis 0,804 Proz.

Um aber eine zutreffende Vorstellung über den absoluten Verbrauch der verschiedenen Bestandteile der Leibessubstanz zu gewinnen, ist es nötig, diese Zahlen statt auf 1000 Gewichtsteile auf die Zahl der Individuen zurückzuführen, denn 1000 g

Normaltiere entsprechen nicht 1000 g verhungerten Tieren. Das Ergebnis einer solchen Berechnung ist aus der Tabelle VII ersichtlich.

Tabelle VII.

	1000 Stück Normaltiere enthalten g	1000 Stück Karenztiere enthalten g	Absoluter Gewichts-verlust in g	Gewichtsverlust in Proz. der ursprüngl. Menge
Wasser	638,39	409,70	— 228,69	— 35,82
Trockensubstanz	256,61	217,84	— 38,77	— 15,11
Asche	15,49	11,08	— 4,41	— 28,47
Organ. Substanz	241,12	206,76	— 34,36	— 14,25
Chitin	36,65	36,82	+ 0,17	+ 0,46
Eiweißkörper .	135,55	105,82	— 29,73	— 21,93
Fette u. a. . .	35,26	5,06	— 30,20	— 85,65
Extraktivstoffe .	34,66	59,06	+ 24,40	+ 70,40

Beim Hungern werden somit fast 85,65 Proz. des ursprünglichen Fettes verbraucht; der Eiweißzerfall beträgt bloß 21,93 Proz.; der Wasserverlust 35,82 Proz. Die Chitinmenge bleibt innerhalb der Fehlergrenzen unverändert.

Der absolute Verlust an organischen Stoffen gestattet, die mittlere Menge der beim Hungern verbrauchten Energie zu berechnen. Wenn wir folgende kalorische Aquivalente zu Grunde legen, 1 g Eiweiß = 4,32 Kal., 1 g Fett = 9,46 Kal., 1 g Chitin als Kohlehydrat = 4,18 Kal. und 1 g Extraktivstoffe = 3,154 Kal.*), so würde das kalorische Äquivalent von 1000 normalen Maikäfern = 1181,6 Kal. betragen. Das kalorische Äquivalent von 1000 verhungerten Maikäfern ergibt sich zu 845,2 Kal. Während des Hungerns haben also die Maikäfer rund 336,4 Kal. verbraucht. Das macht 28,47 Proz. der gesamten vor dem Hungern vorhandenen Energie aus. Im Mittel war der Energie-Verbrauch pro Tag 16,02 Kal., pro Kilo Gewicht und 24 Stunden betrug er 17,89 Kal., pro Stunde und Kilo 0,7454 Kal.

Von einzelnen Bestandteilen, welche an dem Gewichtsverluste Anteil nehmen, habe ich dem Phosphor und Stickstoff größere Aufmerksamkeit zugewendet. Den Gesamtphosphor des Organismus habe ich in drei Fraktionen bestimmt, den in Alkohol und Ätherextrakt der getrockneten Käfer übergehenden Teil (Lecithinphoshor), den in die wässerige Auskochung übergehenden Teil (anorganischer Phosphor) und den Rest, der bloß beim Erhitzen

*) Frentzel und Schreuer, Du Bois, Arch. 1902, S. 282.

mit Natronlauge zugleich mit Eiweißkörpern in Lösung geht (Phosphor des Phospho- und Nucleoproteide u. s. w. oder schlechtweg Eiweißphosphor).

Für jede Bestimmung wurden natürlich mindestens zwei Analysen gemacht; in einigen Fällen habe ich auch gesondert den Gesamtphosphorgehalt der Maikäfer bestimmt. Die Summe der verschiedenen Arten des Phosphors stimmte mit dem Gesamtphosphorgehalt innerhalb der analytischen Fehlergrenzen.

Die Resultate finden sich in den Tabellen VIII und IX zusammengestellt.

Tabelle VIII.

	Kontrolltiere			Karenztiere		
	Proz.-Gehalt an P_2O_5 in d. Trockensubstanz	Proz.-Gehalt an P_2O_5 in der frischen Substanz	In Proz. ausgedrückt	Proz.-Gehalt an P_2O_5 in d. Trockensubstanz	Proz.-Gehalt an P_2O_5 in der frischen Substanz	In Proz. ausgedrückt
Gesamt P_2O_5 . .	1,910	0,5476	100,00	1,630	0,5658	100,00
P_2O_5 in Alkoholäther-Extrakt .	0,410	0,1175	21,47	0,087	0,0302	5,64
P_2O_5 in Wasser-Extrakt	0,815	0,2337	42,65	1,332	0,4623	81,88
P_2O_5 der Nucleine	0,685	0,1964	35,88	0,210	0,0733	12,48

Tabelle IX.

	Gesamt-P_2O_5	P_2O_5 des Alkoholäther-Extraktes	P_2O_5 des Wasser-Extraktes	P_2O_5 der Nucleine
In 1000 Stück Normaltieren . .	4,90	1,05	2,09	1,76
In 1000 Stück Karenztieren . .	3,55	0,19	2,90	0,46
Absoluter Verlust	— 1,35	— 0,86	+ 0,81	— 1,30
Verlust in Proz.	— 27,55	— 81,91	+ 34,91	— 73,86

Aus beiden Tabellen ersieht man, daß beim Hungern ein großer Teil des Lecithinphosphors (81,91 Proz.) und des Eiweißphosphors (73,86 Proz.) verbraucht wird, indem er in anorganische Verbindungen übergeht; ein Teil davon wird aber ausgeschieden, so daß die Gesamtmenge des Phosphors um 27,4 Proz. abnimmt.

Was die verschiedenen Formen des Stickstoffes betrifft, so wird der Gehalt daran beim Hungern stark verändert. Ich habe direkte Bestimmungen von Gesamtstickstoff, Chitinstickstoff, wasserlöslichem und ätheralkohollöslichem Stickstoff ausgeführt. Der

Rest des Gesamtstickstoffs nach Abzug des in Äther, Alkohol und Wasser löslichen, sowie des Chitinstickstoffs ist als Eiweißstickstoff in Rechnung gebracht.

Tabelle X.

	Normaltiere			Karenztiere		
	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	In Proz. ausgedrückt	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	In Proz. ausgedrückt
Gesamt-Stickstoff .	14,597	4,185	100,00	14,530	5,044	100,00
Äther- u. alkohollöslicher Stickstoff	0,594	0,170	4,07	0,286	0,099	1,94
Wasserlöslicher Stickstoff . . .	1,884	0,540	12,90	3,198	1,110	22,01
Chitinstickstoff . .	0,944	0,270	6,47	1,144	0,397	7,87
Eiweißstickstoff .	11,175	3,205	76,56	9,902	3,438	68,15
Ammoniakstickstoff	0,640	0,183	4,38	0,681	0,236	4,69

Tabelle XI.

	Gesamt-N	Äther-alkohollöslicher N	Wasserlöslicher N	Chitin-N	Eiweiß-N	NH_3-N
In 1000 Stück Normaltieren . . .	37,46	1,52	4,72	2,42	26,77	1,64
In 1000 Stück Karenztieren . . .	30,93	0,62	6,97	2,49	21,57	1,48
Absolute Veränderung . . .	— 6,53	— 0,90	+ 2,25	+ 0,07	— 5,20	— 0,16
Veränderung i. Proz.	— 17,43	— 59,08	+ 47,64	+ 2,80	— 19,42	— 9,76

Beim Hungern wird sonach das Verhältnis der verschiedenen Formen des Stickstoffs gegeneinander stark verschoben. Die Eiweißstoffe werden oxydiert und der Stickstoff geht in die Extraktivstoffe über. Der Gehalt an alkohollöslichem Stickstoff und Ammoniak-Salzen wird kleiner.

Über 17,43 Proz. des Stickstoffes werden beim Hungern ausgeschieden; der Verlust an Eiweißstickstoff beträgt 19,42 Proz. der ursprünglichen Menge. Der Ammoniak- und der in Alkohol-Äther lösliche Stickstoff (zum größten Teil Harnstoff) werden um 9,76 Proz. und 59,08 Proz. vermindert. Die Erhöhung des Chitin-

stickstoffs kann damit erklärt werden, daß sich im Chitin stickstoffhaltige, in 20-proz. Natronlauge unlösliche Pigmente ablagern. In der Tat war das rohe Chitin bei den hungernden Tieren viel dunkler gefärbt. Die gereinigten Chitinpräparate erwiesen sich aber im Stickstoffgehalt als identisch.

Die Tatsache, daß der an Eiweiß und Nuclein gebundene Phosphor beim Hungern in größerer Menge verbraucht wird, veranlaßte mich, einige Bestimmungen der Pentosen oder richtiger der furfurolgebenden Substanzen auszuführen. Die Menge des Furfurolphloroglucidniederschlages auf Pentosen berechnet ergab, daß 1000 Normaltiere 2,134 g Pentosen, 1000 Karenztiere 2,196 g enthielten. Die Differenz zwischen diesen zwei Werten fällt in die Fehlergrenzen, so daß man annehmen kann, daß sich die Menge der furfurolgebenden Substanzen beim Hungern nicht ändert. Das scheint mir eine beachtenswerte Tatsache, die ich näher zu untersuchen beabsichtige. Die bei dem Zerfall der Nucleoproteide freiwerdenden Pentosen bezw. deren Vorstufen scheinen sich nicht weiter zu oxydieren. In welcher Form sie zurückbleiben (an Eiweißkörper gebunden oder nicht), ist noch zu entscheiden.

Die Menge des Materials gestattete uns auch eine ausführliche Analyse der Salze durchzuführen. Ich habe Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Eisen, Chlor, Schwefel und Phosphor, sowie die Menge der unlöslichen und löslichen Salze bestimmt.

Tabelle XII.

	Normaltiere			Karenztiere		
	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	in Proz. der Gesamtasche	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	in Proz. der Gesamtasche
Gesamt-Asche . .	6,039	1,729	100,00	5,088	1,766	100,00
Lösliche Salze . .	3,666	1,049	60,71	2,416	0,839	47,48
Unlösliche Salze .	2,373	0,680	39,29	2,672	0,927	52,52
P_2O_5	1,910	0,548	31,63	1,630	0,569	32,03
SO_3	0,989	0,283	16,36	0,844	0,293	16,59
Cl	0,280	0,080	4,64	0,153	0,053	3,01
K_2O	0,814	0,233	13,48	0,854	0,296	17,30
Na_2O	0,276	0,079	4,53	0,342	0,119	6,72
CaO	1,103	0,316	18,27	0,585	0,203	11,60
MgO	0,119	0,034	1,97	0,132	0,046	2,59
Fe_2O_3	0,334	0,095	5,53	0,368	0,127	7,23

Tabelle XIII.

	Absoluter Gehalt									
	P_2O_5	SO_3	Cl	K_2O	Na_2O	CaO	MgO	Fe_2O_3	lösliche Salze	unlösliche Salze
In 1000 Stück Normaltieren	4,90	2,54	0,72	2,09	0,71	2,83	0,30	0,80	9,41	6,09
In 1000 Stück Hungertieren	3,55	1,84	0,33	1,86	0,74	1,28	0,29	0,80	5,16	5,82
Veränderung in g	– 1,35	– 0,70	– 0,39	– 0,23	+ 0,03	– 1,55	– 0,01	0	– 4,25	– 0,27
Veränderung in Proz.	–27,55	–27,56	–43,03	–11,00	+ 4,22	–54,77	– 3,33	0	–45,16	– 4,43

Die angeführten Zahlen zeigen, daß sich beim Hungern der Gesamtgehalt an Salzen auf 28,47 Proz. vermindert. Diese Verluste beziehen sich hauptsächlich auf lösliche Salze, deren Menge um 45,16 Proz. kleiner wird. Die unlöslichen Salze bleiben größtenteils in dem Organismus und werden bloß zu 4,43 Proz. ausgeschieden. Die größten Verluste fallen auf Chlor (— 43,03 Proz.) und Calcium (— 54,77 Proz.); die Menge der Phosphor- und Schwefelsäure vermindert sich um 27,55 Proz. und 27,56 Proz. Es scheint überhaupt, daß beim Hungern der Organismus mehr Säuren als Basen ausscheidet. Einige anorganische Bestandteile (Na, Mg und Fe) scheinen fast gar nicht verloren zu gehen.

Bunge*) hat in einer Arbeit die Beziehungen der Aquivalente des Kaliums und Natriums bei Insekten zusammengestellt. Da die Maikäfer ausschließlich pflanzenfressende Insekten sind, so ist es vielleicht interessant, meine Werte mit den an anderen Tieren ermittelten zu vergleichen.

Tabelle XIV.

	K_2O	Na_2O	Verhältnis von Na : K
Bezold. Arion empiricorum	3,134	0,980	1 : 2,1
Bunge. Pieris brassicae	4,1085	0,2403	1 : 2,70
Pygaera Bucephala	5,513	0,6716	1 : 50,69
Slowtzoff. Maikäfer	2,330	0,79	1 : 1,97

Das Ergebnis meiner Arbeit möchte ich in den Hauptzügen zusammenfassen, wie folgt:

1. Bei absoluter Karenz verlieren die Maikäfer 23,99 bis

*) Bunge, Zeitschr. für Biol. 10, S. 297.

23,76 Proz. des ursprünglichen Gewichtes und verbrauchen etwa 28,47 Proz. ihres gesamten Energievorrates.

2. Dabei sind die täglichen Gewichtsverluste an den ersten Tagen am größten (2,39 Proz. des ursprünglichen Gewichtes), sinken dann auf ein Minimum (bis 0,66 Proz.) und zeigen eine prämortale Steigerung.

3. Die Verluste betreffen vorzugsweise den Gehalt an Wasser, Fett und Eiweiß. Das Chitin scheint nicht angegriffen zu werden.

4. Die Verluste zeigen folgende Reihenfolge: Fett (85,65 Proz.), Wasser (35,82 Proz.), Asche (28,47 Proz.), Eiweißkörper (21,93 Proz.).

5. Während des Hungerns verbrauchen die Maikäfer pro 24 Stunden und pro Kilo Gewicht 17,89 Kal.; pro Stunde und Kilo 0,745 Kal.

6. Die phosphorhaltigen Eiweißkörper werden stark angegriffen, so daß etwa 75 Proz. des Eiweißphosphors abgespalten werden; die Menge der Pentosen im Organismus scheint sich nicht zu ändern.

7. Der Gehalt an Ammoniak-Salzen und an in Alkohol und Äther löslichem Stickstoff (zum größten Teil Harnstoff) erfährt eine Verminderung.

8. Die Hauptverluste an Salzen beziehen sich auf lösliche Salze. Natrium, Magnesium und Eisen werden anscheinend nicht ausgeschieden. Die Verluste sind am größten bei Calcium, Chlor, Schwefel- und Phosphorsäure.

Analytische Belege.

I. Normaltiere.

Ätherextrakt.

4,3964 g	Trockensubst. ergaben	0,6051 g	Ätherextr.	13,764 Proz.
7,3984 g	. . . .	1,0148 g	. . . .	13,718 „
			Mittel	13,741 Proz.

Wasserextrakt.

4,3964 g	. . . .	0,5928 g	Wasserextr.	13,484 Proz.
7,3984 g	. . . .	1,0010 g	. . . .	13,530 „
			Mittel	13,507 Proz.

Chitin (in 20-proz. Natronlauge unlöslich)

4,3964 g	. . . .	0,6289 g	unlösl. Rest	14,304 Proz.
7,3984 g	. . . .	1,0553 g	. . . .	14,264 „
			Mittel	14,284 Proz.

Gesamt-Stickstoff.

0,1629 g	. . . . Verbraucht	17,2 cc.	1/10 Säure	14,78 Proz. N.
0,1863 g	. . . .	19,2 cc.	„	14,43 „ „
0,2141 g	. . . .	22,3 cc.	„	14,58 „ „
			Mittel	14,597 Proz. N.

Stickstoff des Ätheralkoholextraktes.

2,0055 g	Verbraucht 8,2 cc. 1/10 Säure	0,572 Proz. N.
1,8212 g	8,0 cc. „	0,615 „ „
	Mittel	0,594 Proz. N.

Stickstoff des Wasserextraktes.

2,0055 g	Verbraucht 27,0 cc. 1/10 Säure	1,885 Proz. N.
1,8212 g	24,5 cc. „	1,884 „ „
	Mittel	1,884 Proz. N.

Stickstoff des Chitins.

0,2936 g	Verbraucht 13,9 cc. 1/10 Säure	6,62 Proz. N.
0,3184 g	15,0 cc. „	6,60 „ „
	Mittel	6,61 Proz. N.

Stickstoff in Form von NH_3.

2,2734 g	mit MgO destilliert; verbraucht 10,4 cc.	0,6404 Proz. N.

Gesamt-Phosphor.

1,1790 g	0,0350 g P_2O_7Mg	1,893 Proz. P_2O_5
1,1390 g	0,0344 g	1,926 „ „
	Mittel	1,910 Proz. P_2O_5

Phosphor des Ätheralkoholextraktes

2,0230 g	0,0124 g P_2O_7Mg	0,391 Proz. P_2O_5
2,3140 g	0,0156 g	0,430 „ „
1,4932 g	0,0086 g	0,410 „ „
	Mittel	0,410 Proz. P_2O_5

Phosphor des Wasserextraktes.

1,8292 g	0,0235 g P_2O_7Mg	0,819 Proz. P_2O_5
1,1752 g	0,0148 g	0,803 „ „
1,3346 g	0,0172 g	0,822 „ „
	Mittel	0,815 Proz. P_2O_5

Phosphor der Eiweißkörper.

1,8324 g	0,0197 g $Mg_2P_2O_7$	0,685 Proz. P_2O_5

Pentosenbestimmung.

2,9782 g	0,0165 g Phloroglucidniederschl.	0,554 Proz.
3,1772 g	0,0175 g	0,5508 „
	Mittel	0,5524 Proz.

Schwefel-Bestimmung.

1,3344 g	0,0384 g $BaSO_4$	0,9880 Proz. SO_3
0,7494 g	0,0216 g	0,9899 „ „
	Mittel	0,989 Proz. SO_3

Chlor-Bestimmung.

0,9253 g	0,0043 g ClNa	0,282 Proz. Cl.
1,3513 g	0,0062 g	0,278 „ „
	Mittel	0,280 Proz. Cl.

Eisen-Bestimmung.

1,1347 g	0,0038 g Fe_2O_3	0,335 Proz. Fe_2O_3
1,1412 g	0,0038 g Fe_2O_3	0,333 „ „
	Mittel	0,334 Proz. Fe_2O_3

K- und Na-Bestimmung.

1,6900 . . 0,0312 g ClK + ClNa 1,8415 Proz.
. . . . . . 0,0724 g K_2PtCl_6 1,3148 „ ClK 0,8308 Proz. K_2O
0,5307 Proz. ClNa 0,2817 Proz. Na_2O

2,1540 g . . 0,0382 g ClK + ClNa 1,7734 Proz.
. . . . . . 0,0886 g K_2PtCl_6 1,2630 Proz. ClK 0,7981 Proz. K_2O
0,5104 Proz. ClNa 0,2709 Proz. Na_2O

Mittel 0,814 Proz. K_2O
0,276 Proz. Na_2O

Magnesium-Bestimmung.

1,8361 g . . 0,0060 g MgP_2O_7 . . . . 0,1188 Proz. MgO.
2,0400 g . . 0,0067 g . . . . 0,1193 „ „
Mittel 0,119 Proz. MgO.

Calcium-Bestimmung.

0,7816 g . . . . 0,0086 g Cal. . . . . 1,105 Proz. CaO.
1,8361 g . . . . 0,0202 g Cal. . . . . 1,102 „ „
Mittel 1,035 Proz. CaO.

Unlösliche Salze.

1,347 g . . 0,0316 g . . . . 2,348 Proz.
1,9183 g . . 0,0460 g . . . . 2,398 „
Mittel 2,373 Proz.

II. Die Karenztiere.

Ätherextrakt.

9,3776 g . . . 0,2104 g . . . . 2,243 Proz.
6,3314 g . . . 0,1518 g . . . . 2,398 „
Mittel 2,3205 Proz. Fett

Wasserextrakt.

5,9212 g . . . 1,6106 g . . . . 27,20 Proz.
6,3284 g . . . 1,7100 g . . . . 27,02 „
Mittel 27,11 Proz.

Chitin (in 20-proz. Natronlauge unlöslich).

5,9212 g . . . 0,9995 g Chitin . . . . 16,88 Proz.
6,3284 g . . . 1,0708 . . . . 16,92 „
Mittel 16,90 Proz.

Gesamt-Stickstoff.

0,2118 g Verbraucht 22,3 cc. 1/10 Säure . . . . . 14,74 Proz. N
0,2764 g „ 28,3 cc. . . . . 14,33 „ „
0,2350 g „ 24,4 cc. . . . . 14,53 „ „
Mittel 14,53 Proz. N

Stickstoff des Alkoholätherextraktes.

1,4620 g Verbraucht 3 cc. . . . . 0,287 Proz. N
3,4416 g „ 7 cc. . . . . 0,285 „ „
Mittel 0,286 Proz. N

Stickstoff des Wasserextraktes.

3,2963 g Verbraucht 75 cc. . . . . 3,185 Proz. N
3,2930 g „ 75,5 cc. . . . . 3,210 „ „
Mittel 3,1975 Proz. N

Stickstoff des Chitins.

0,2874 g Verbraucht 13,9 cc. Säure . . . . 6,77 Proz.

Stickstoff in Form von NH_3.

2,1160 g Verbr. 10,3 cc. . . . . 0,681 Proz.

Gesamt-Phosphor.

1,1502 g . . 0,0300 g MgP_2O_7 . . . . 1,66 Proz. P_2O_5
1,4290 g . . 0,0347 g . . . . 1,56 „ „
0,6801 g . . 0,0178 g . . . . 1,67 „ „
Mittel 1,63 Proz. P_2O_5

Phosphor des Ätheralkoholextraktes.

4,8650 g . . 0,0062 g MgP_2O_7 . . . . . . 0,0811 Proz. P_2O_5
2,4565 g . . 0,0036 g . . . . 0,0934 „ „
Mittel 0,0872 Proz. P_2O_5

Phosphor des Wasserextraktes.

4,8650 g . . . 0,0100 g MgP_2O_7 . . . . . . 1,310 Proz. P_2O_5
3,2962 g . . . 0,0070 g . . . . 1,354 „ „
Mittel 1,332 Proz. P_2O_5

Phosphor der Eiweißkörper.

3,2962 g . . . 0,0102 g MgP_2O_7 . . . . . . 0,197 Proz. P_2O_5
3,0108 g . . . 0,0106 g . . . . 0,224 „ „
Mittel 0,210 Proz. P_2O_5

Pentosenbestimmung.

3,2442 g . . 0.0260 g Phlorglucidnied. . . . . . . 0,801 Proz.
3,3658 g . . 0,0269 g . . . . 0,801 „
3,0250 g . . 0,0245 g . . . . 0,810 „
Mittel 0,803 Proz.

Schwefel-Bestimmung.

1,2710 g . . 0,0316 g $BaSO_4$ . . . . 0,8539 Proz. SO_3
1,4015 g . . 0,0464 g . . . . 0,8332 „ „
Mittel 0,8440 Proz. SO_3

Chlor-Bestimmung.

1,2682 g . . 0,0032 g ClNa . . . . 0,1531 Proz. Cl.
1,1955 g . . 0,0030 g . . . . 0,1530 „ „
Mittel 0,153 Proz. Cl.

Eisen-Bestimmung.

0,6517 g . . 0,0028 Fe_2O_3 . . . . 0,369 Proz. Fe_2O_3
1,3090 g . . 0,0048 g . . . . 0,367 „ „
Mittel 0,368 Proz. Fe_2O_3

K- und Na-Bestimmung.

1,6640 g . . 0,0328 g ClNa + ClK 1,971 Proz.
. . . . . . 0,0728 g K_2PtCl_6 1,343 Proz. ClK 0,8489 Proz. K_2O
0,628 Proz. ClNa 0,3333 Proz. Na_2O
1,6811 g ergab 0,0340 g ClNa + ClK 2,023 Proz.
. . . . . . 0,0745 g K_2PtCl_6 1,361 Proz. ClK 0,8600 Proz. K_2O
0,662 Proz. ClNa 0,3514 Proz. Na_2O
Mittel K_2O 0,854 Proz.
Na_2O 0,342 „

Mg-Bestimmung.

1,5272 g . .	0,0072 g Mg P_2O_7	0,1308 Proz. Mg O
2,0590 g . .	0,0100 g	0,1340 „ „
		Mittel 0,1324 Proz. Mg O

Ca-Bestimmung.

1,2945 g . . .	0,0075 g Ca	0,5794 Proz. Ca
1,1700 g . . .	0,0069 g	0,5897 „ „
		Mittel 0,5846 Proz. Ca

Unlösliche Salze.

1,6640 g . . .	0,0430 g	2,584 Proz.
1,6811 g . . .	0,0464 g	2,760 „
		Mittel 2,672 Proz.

IV.

Über das Haarpigment.

Von Dr. **Eduard Spiegler** (Wien).
Docent an der Wiener Universität.
Aus dem chem. Laboratorium von Hofr. A. Lieben (Wien).

Erste Mitteilung.

Die Frage nach der Herkunft des tierischen Pigmentes beschäftigt seit Dezennien die biologische Forschung. Trotz zahlreicher zum Teil ausgezeichneter Untersuchungen hierüber, ist es bisher nicht möglich gewesen, die Gegensätze zu überbrücken. Während die einen behaupten, das Pigment sei ein Abkömmling des Blutfarbstoffes, leugnen die anderen, daß der Blutfarbstoff mit der Pigmentbildung in irgend einem Zusammenhange stehe, vielmehr sei die Pigmentbildung eine Funktion gewisser Zellen in demselben Sinne wie die Bildung anderer spezifischer Produkte. Wie etwa Pepsin oder Salzsäure das Produkt bestimmter Zellen ist, so werde auch das Pigment des tierischen und menschlichen Organismus von solchen erzeugt, ohne daß damit über die Materialien, aus denen das Pigment gebildet wird, irgend etwas ausgesagt würde. Über die außerdem noch bestehenden Meinungsdifferenzen, welchen Zellen speziell — ob Epidermis- oder Bindegewebszellen — diese Funktion zukomme, über dieses gleichfalls wichtige Problem wollen wir hier hinweggehen, weil uns dies von der Frage, die den Gegenstand unserer Untersuchungen bildet, zu weit abführen würde.

Wir wollen zunächst diejenigen Argumente anführen, welche hauptsächlich für den hämatogenen Ursprung des Pigmentes geltend gemacht worden sind.

Bereits im Jahre 1821 trat Breschet*) auf Grund chemischer Untersuchungen, die Barruel und Lassaigne an melanotischen Tumoren von Pferden und Menschen angestellt hatten, für die Abstammung des Pigmentes aus dem Blute ein.

---

*) Breschet, Considérations, Paris 1821.

John Bennet*) fand, daß der Farbstoff in kochender Salpetersäure löslich sei; er erklärte, derselbe enthalte Schwefeleisen und stamme daher aus dem Blute.

Auch Gautier**) hielt den Ursprung für einen hämatogenen. Nach Hurtel d'Arboval***) sind die Melanosen zuerst weiß und werden nach und nach durch eine Umbildung des Blutfarbstoffes gefärbt.

Dreßler†) scheint der erste gewesen zu sein, der es versuchte, den Farbstoff rein darzustellen. Bei beiden Untersuchungen, die er anstellte, fand er den Farbstoff schwefelfrei, hingegen Spuren von Eisen, in einem Falle außerdem noch etwas Kieselsäure.

Nach Langhans††) werden Blutkörperchen von lymphoiden Zellen aufgenommen und von diesen in körniges Pigment umgewandelt, was von Pouchet bei lebenden Fischen bestätigt wurde.

Nach Gussenbauer†††) kommt es unter hierzu günstigen Verhältnissen zu einer Abgabe von Blutfarbstoff an das Plasma. In dem letzteren gelöst wird derselbe von gewissen Zellen aufgenommen und bildet sich erst später zu körnigem Pigment um.

Demiéville*†) tritt wegen Vorkommens des Pigmentes in der nächsten Nähe der Blutgefäße mit Entschiedenheit dafür ein, daß dieses aus dem Blute stammt.

Nach Quincke*††) werden die Blutkörperchen von Bindegewebszellen aufgenommen, welche sie zu Pigment verarbeiten. Es können aber auch die Blutkörperchen im Serum aufgelöst werden, das Hämoglobin diffundiere in das umgebende Gewebe, welche dasselbe in Hämatin und Pigment verwandle.

Perls*†††) gab zur Bestimmung des Eisengehaltes in melanotischen Tumoren eine Reaktion an, die bekanntlich darin besteht, daß die Schnitte zuerst in eine Ferrocyankaliumlösung gelegt, hierauf mit HCl oder HNO_3 behandelt werden. Eintretende Blaufärbung dient als Beweis für den Eisengehalt des Pigmentes. Doch spreche der negative Ausfall der Reaktion nicht gegen den hämatischen Ursprung des Pigmentes. Vossius†*) und Hirschberg gelang jedoch mittelst der erwähnten Reaktion in mehreren Fällen der Nachweis von Eisen in pigmentierten Geschwülsten.

Nach Nothnagel†**) wird beim Morbus Addisonii das Pigment nicht in den Retezellen erzeugt, sondern von der Cutis her diesen zugeführt. Die Cutiszellen bilden das Pigment aus Blutfarbstoff, wofür die Farbe des Pigmentes, sowie dessen Lage nächst den Blutgefäßen spricht.

---

*) Edinb. Monthly Journal, August 1848, pag. 98.

**) Gautier, Chimie appliquée à la Physiologie. Paris 1874.

***) Citiert nach Decking: über Melanosarcom, Inaugural-Dissertation. Würzburg 1887.

†) Vierteljahrschrift für prakt. Heilkunde. Prag 1865, 8.

††) Langhans, Beobachtungen über Resorption der Extravasate und Pigmentbildung in denselben. Virchows Archiv, **49**.

†††) Gussenbauer: Über die Pigmentbildung in melanotischen Sarkomen und einfachen Melanomen der Haut. Virchows Archiv, **63**.

*†) Demiéville: Über Pigmentflecke der Haut. Virchows Archiv, **81**.

*††) Quincke: Beitrag zur Lehre vom Icterus. Virchows Archiv, **95**.

*†††) Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie 1886.

†*) Arch. f. Ophtalmologie, **31**.

†**) Zur Pathologie des Morbus Addisonii, Zeitschr. f. klin. Med. 1885.

Auch Riehl*) kam für den Morbus Addisonii zu ähnlichen Resultaten und spricht sich für das Entstehen des Pigmentes aus dem Blute aus. Er begründet dies mit dem Auftreten von freiem Blut extravaskulär im Gewebe und von pigmenthaltigen beweglichen Cutiszellen unmittelbar bei den Hämorrhagieen. Doch handelt es sich hier um pathologisches Pigment. Hingegen fand Riehl**), daß das Pigment menschlicher Haare diesen durch besondere eigenartige, unregelmäßig gestaltete Zellen zugeführt wird.

Nach Oppenheimer***) läßt sich hinsichtlich der Pigmentbildung in den Sarkomen leicht erkennen, daß die Pigmentbildung in denselben von örtlich beschränkten Bedingungen abhänge, welche auf die Blutgefäße, zum Teil auf die roten Blutkörperchen hinweisen, und auch nach List†) weise die Tatsache, daß die Pigmentzellen den Blutgefäßen folgen, auf eine Beziehung des Pigmentes zum Blute hin.

Außerdem konnte List (l. c.) an der Crista des Schwanzes von Triton cristatus innerhalb der Blutkörperchen in den Gefäßen des oberflächlichen dicht unter der Epidermis liegenden Kapillarnetzes das Auftreten von einzelnen Pigmentkörperchen und von Klümpchen beobachten und schloß daraus, daß das Pigment sich zuerst aus dem Zellkörper und dann aus dem Kerne bilde, sich innerhalb des Gefäßes zu größeren Klümpchen ansammle und dann durch die Wandung des Gefäßes nach außen befördert werde.

Die Bilder Lists erregten bei Jarisch††) Zweifel, ob nicht etwa Lists „Pigment in den roten Blutkörperchen“ durch eingedrungene Luft zustande gekommen sei, um so mehr, als List sich über die optischen Eigenschaften besagten Pigmentes nicht näher ausgesprochen habe. List†††) beschrieb außerdem an Querschnitten durch Forellenembryonen von 2 cm Länge in den vorderen, oberen und seitlichen Partieen des Dotters ganz eigentümliche Zerfallserscheinungen. Man bemerke nämlich in diesen Dotterpartieen größere oder kleinere Lakunen, die nichts anderes als Zerfallserscheinungen des Dotters, und wie eine genaue Beobachtung ergebe, nichts anderes als Vorstadien der Pigmentkörperchen seien.

Hinsichtlich der früher erwähnten von Jarisch bezweifelten Meinung Lists liegt zwar eine Beobachtung Meyersons†*) vor, wonach er im Froschblute stets pigmentierte Zellen gefunden habe, doch konnte Meyerson sich selbst überzeugen, daß es sich hierbei um farblose Blutkörperchen gehandelt habe. Übrigens hat Saviotti†**) gezeigt, daß

*) G. Riehl, Zur Pathologie des Morbus Addisonii, Zeitschr. f. klin. Medizin, **10**, 521.

**) G. Riehl, Arch. f. Dermat. und Syphilis 1884, S. 33.

***) Oppenheimer, Beiträge zur Lehre der Pigmentbildung in melanotischen Geschwülsten. Virchows Archiv, **96**.

†) List, Über die Herkunft des Pigmentes in der Oberhaut. Biologisches Centralblatt, 10. Bd.

††) Jarisch, Über die Anatomie und Entwickelung des Oberhautpigmentes beim Frosche. Arch. f. Derm. u. Syph. 1891, S. 559.

†††) List, l. c. S. 29 und 30.

†*) Meyerson, Zur Pigmentfrage. Virchows Archiv, S. 118.

†**) Saviotti, Über die Einwanderung der Pigmentzellen in die Blutgefäße an der Schwimmhaut des Frosches. Zentralbl. f. mediz. Wissenschaften, 1870.

Pigmentzellen ja auch durch die Gefäßwand in die Gefäße einzuwandern vermögen, so daß der Nachweis pigmentierter Zellen im Blute keineswegs die Entstehung des Pigmentes aus demselben bedingt. Unter den Vertretern der Ansicht vom hämatogenen Ursprung des Pigmentes finden wir auch Kölliker*), wenn er auch hinsichtlich des Pigmentes der Retina bei den Wirbeltieren eine selbständige Bildung des Pigmentes zuläßt, ein Standpunkt, der hinsichtlich der Iris und Chorioidea von Cornil und Ranvier**) geteilt wird.

Nach Duirck***) stammt das Pigment aus dem Blutfarbstoffe und kommt dessen Bildung unter Mitwirkung von kontraktilen Zellen so zustande, daß einerseits aus den eingeschlossenen roten Blutkörperchen direkt Pigmentgranula hervorgehen, die zu gewissen Zeiten die Reaktion von Perls zeigen; andererseits findet in denselben eine Ansammlung von Blutfarbstoff des durch Exosmose aus einzelnen freien Blutkörperchen ausgetretenen Farbstoffes und Konsolidierung desselben zu Pigmentkörnern statt.

Halpern†), welcher das Pigment an der Skrotalhaut des Negers studierte, fand das Pigment in der Umgebung der Gefäße, jedoch auch an anderen Stellen, er konnte aber nirgends in der Cutis Thromben oder Blutaustritte sehen, die auf die Entwickelung des Pigmentes aus Blutkörperchen hingewiesen hätten.

Langhans††) suchte auf experimentellem Wege der Frage näher zu treten, indem er Tieren Blutgerinsel unter die Haut brachte. Die roten Blutkörperchen wurden von kontraktilen Zellen aufgenommen und in Pigment verwandelt, welches indes nach einiger Zeit vollkommen verschwand. Zu ähnlichen Resultaten kam Quincke nach Injektion von Blut in das Unterhautzellgewebe von Hunden und Ehrmann nach Quetschungen, die von Blutaustritten gefolgt waren.

M. B. Schmidt†††) tränkte Holundermarkplättchen mit Blut und brachte sie Fröschen und Kaninchen unter die Haut. Er fand nach einiger Zeit kleine Pigmentkörnchen von goldgelber Farbe, teils frei, teils in Zellen.

Einer der eifrigsten Verfechter der Lehre vom hämatogenen Ursprung des Pigmentes ist Ehrmann†*), welcher auf Grund umfassender entwickelungsgeschichtlicher Untersuchungen über das Pigment sowohl

---

*) Kölliker, Über die Entstehung des Pigmentes in den Oberhautgebilden. Zeitschr. f. wissensch. Zoologie, 1887, 46.

**) Cornil et Ranvier, Manuel d'Histologie pathologique.

***) Duirck, Beitrag zur Lehre von den Veränderungen und der Altersbestimmung von Blutungen im Zentralnervensysteme.

†) J. Halpern, Über das Verhalten des Pigments in der Oberhaut des Menschen. Archiv für Dermatologie und Syphilis, 1891.

††) Langhans, Beobachtungen über die Resorption der Extravasate u. s. w. Virchows Archiv, 49.

†††) M. B. Schmidt, Über die Verwandtschaft der hämatogenen und autochtonen Pigmente u. s. w. Virchows Archiv, 115.

†*) Ehrmann, Das melanotische Pigment und die pigmentbildenden Zellen des Menschen und der Wirbeltiere in ihrer Entstehung nebst Bemerkungen über Blutbildung und Haarwechsel. Bibliotheca medica. Abtl. D II, Heft VI, 1896.

originär pigmentierter als auch originär pigmentloser Tiere die hämatogene Lehre vom Ursprung zu stützen versucht, ohne jedoch, wie Rosenstadt*) darlegte, hierfür beweisende Argumente anführen zu können.

Schließlich hat noch mein verehrter verstorbener Lehrer Kaposi**) in einem geistvollen Vortrage die Tatsachen, die für und gegen die Entstehung des Pigmentes aus dem Blute sprechen, von klinischem Standpunkte aus beleuchtet. Die von ihm angeführten klinischen Tatsachen führen ihn zu dem Ergebnis, daß der Ursprung des Pigmentes nicht im Blute gesucht werden könne; eine ganze Reihe klinischer Tatsachen seien bei dieser Annahme vollkommen unverständlich.

Die große Zahl der angeführten Arbeiten, deren Aufzählung übrigens keineswegs auf Vollständigkeit Anspruch macht, bezieht sich fast ausschließlich auf die Frage, ob das Pigment aus dem Blutfarbstoffe stamme oder nicht. Die Theorie der Pigmentbildung wäre mit der Lösung dieser Frage noch keineswegs erschöpft, weil zwei weitere Fragen ausständig sind, welche lauten: 1. Kann Pigment von der Epidermis erzeugt werden, oder wird es lediglich in der Cutis durch gewisse Zellen erzeugt und erst in die Epidermis transportiert? 2. Kommt nur ganz bestimmten Zellen die Fähigkeit zu, Pigment zu erzeugen oder besitzen auch andere Zellen, namentlich die Epidermiszellen, diese Eigenschaft? Auch diese Frage, außer den genannten, hat seit Dezennien zahlreiche andere Forscher beschäftigt. Wir wollen jedoch auf diese Fragen an dieser Stelle nicht weiter eingehen, weil sie uns von der Frage nach der Natur und Abstammung des Pigmentes allzu sehr abführen würden, mit welcher sie nur in einem entfernteren Zusammenhange stehen.

Auch ich habe mich schon längere Zeit mit der Pigmentfrage beschäftigt, allerdings nur mit Heranziehung histologischer Methoden, ohne daß es mir gelungen wäre, der Frage auf diesem Wege neue Gesichtspunkte abzugewinnen. Ich hoffte hingegen, daß dies auf dem Wege der chemischen Untersuchung möglich sein würde, wenn man das Pigment in entsprechend großen Quantitäten darstellte.

Bevor ich jedoch über meine einschlägigen Untersuchungen berichte, möchte ich in kurzem über das, was in dieser Richtung hierüber bekannt ist, berichten.

Einige ältere Arbeiten, die sich mit dieser Frage beschäftigten, habe ich bereits eingangs dieser Erörterungen erwähnt.

---

*) B. Rosenstadt, Studien über die Abstammung und die Bildung des Hautpigmentes. Arch. f. mikr. Anatomie, 1897, 50.

**) M. Kaposi, Über Pigmentierungen und Entfärbungen der Haut. Archiv für Dermatologie und Syphilis, 1891.

Ich schicke voraus, daß das hauptsächlichste Ausgangsmaterial meiner Untersuchungen das Pigment des schwarzen und des weißen Roßhaares, sowie der schwarzen und weißen Schafwolle war, und erwähne dies hier deshalb, weil die Verfasser gleich einer der ersten unter den neueren Arbeiten, Hodgkinson und Sorby*), das schwarze Pigment schwefelfrei fanden. Da ihr Ausgangsmaterial aber Rabenfedern waren, so ergibt sich, die Richtigkeit der Analysen vorausgesetzt, hieraus eine ganz wesentliche Verschiedenheit der chemischen Zusammensetzung vom Pigment der Roßhaare, welches ich sehr reich an Schwefel- und Kieselsäure fand.

Floyd**) fand in der Negerhaut nach Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther 2,4 Proz. Asche, fast das Doppelte von dem Aschengehalte bei Weißen. Auch der Eisengehalt (2,28 Proz.) ist nach Floyd fast doppelt so groß als bei Weißen. Floyd schließt daraus, daß das Pigment eisenhaltig sei, und hält seine Entstehung aus Blutfarbstoff für wahrscheinlich. Die Untersuchungsresultate Floyds sind aber aus dem Grunde belanglos, weil sein Ausgangsmaterial nicht Pigment, sondern die ganze Negerhaut war.

R. Mays***) stellte aus den Augen von Hühnern ein braunes Pigment dar, über welches er keine näheren Mitteilungen hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung machte, das zwar gegen chemische Agentien sehr resistent war, das sich jedoch leicht in verdünnten Alkalien löste, wenn es vorher dem Sonnenlicht oder verdünnter Salpetersäure ausgesetzt worden war. Das Licht bleichte allmählich den Farbstoff. Da der meine diese Eigenschaft nicht teilt, handelt es sich hier wohl um eine von den hier zu beschreibenden Körpern verschiedene Substanz.

Krukenberg†) standen Federn von Masophaga violacea, Corythaix persa s. Buffoni und Corythaix Verreauxii und anderer bunter Vögel zur Verfügung, doch zeigen die von ihm gewonnenen Farbstoffe von dem unseren so ganz verschiedenes chemisches und physikalisches Verhalten, daß dieselben für uns nicht weiter in Betracht kommen.

---

*) M. R. Hodgkinson and H. C. Sorby, Pigmentum nigrum, the black colouring matter conteined in hairs and feathers. Journal of the chem. society. London 1877, 1.

**) F. P. Floyd, Chemical Character of the pigment of the negro skin. Journal of the chem. society, 1.

***) R. Mays, Über das braune Pigment des Auges. Untersuchungen aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg, 2.

†) Krukenberg, Die Farbstoffe der Federn. Vergleichende physiolog. Studien, 5. Abteilung und 2. Reihe, I. Abteilung.

Wurster*) zeigte, daß der Blutfarbstoff in Gegenwart von Essigsäure und Milchsäure in einen braunschwarzen Körper umgewandelt wird, der unter Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd alle Schattierungen durchmacht, die wir an blonden und braunen Haaren sehen, bis endlich eine weißliche Masse zurückbleibt.

Auf Grund dieser Tatsache erklärt er die verschiedenen Farbenabstufungen der Haare durch Einwirkung von H_2O_2 oder salpetriger Säure auf Eiweiß und Blutfarbstoff: Blond: viel H_2O_2, neutral und sauer; braunschwarz: wenig H_2O_2, sauer; tief schwarz: salpetrige Säure, sauer; rot: viel salpetrige Säure; grau: noch pigmenthaltiges Haar, durch Luft grau erscheinend; diese Luftentwickelung bedingt durch H_2O_2, welches im Haar freien Sauerstoff entwickelt.

N. Sieber**) stellte aus der Chorioidea von Rinderaugen 0,25 g Pigment dar, welches sie nicht nur eisen-, sondern auch schwefelfrei fand. Hieraus ergibt sich schon ein durchgreifender Unterschied gegenüber unserem Haarpigment, was Hirschfeld***) und Landolt†) bestätigt haben. Hingegen ergab das aus Menschenhaaren dargestellte Pigment, welches dieselbe Forscherin dargestellt hatte, eine Zusammensetzung, die sich den von mir gefundenen Zahlen etwas nähert und denen zufolge auch das Pigment des Menschenhaares einen erheblichen Schwefelgehalt aufweist. Sie fand: C 56,14 Proz., H 7,57 Proz., N 8,5 Proz., S 4,10 Proz. Das von ihr untersuchte Haar war ein Gemisch von braunem und schwarzem Haar. Bei einer anderen Analyse, bei welcher nur schwarzes Haar von einem einzigen Individuum verwendet worden war, fand sie bei ungefähr gleicher sonstiger Zusammensetzung den Schwefelgehalt viel niedriger und zwar mit nur 2,71 Proz. Die Frage, ob die Haarfarbe mit dem wechselnden Schwefelgehalte zusammenhängt, will sie hiermit nicht entschieden haben, sondern erst weiteren Untersuchungen vorbehalten. Hinsichtlich des Farbstoffes der schwarzen Roßhaare wird nur die Analyse, C 57,6 Proz., H 4,2 Proz., N 11,6 Proz., S 2,1 Proz. und O 24,5 Proz., ohne nähere Erläuterung angeführt.

Gewiß verschieden von unserem Pigment, wenn auch vielleicht mit ihm verwandt, ist aber der zuerst von Berdez und

---

*) C. Wurster, Das Verhalten des salpetrigsauren Natrons zum Hühnereiweiß und zum Farbstoffe des Blutes. Du Bois-Reymonds Archiv, 1887.

) N. Sieber, Über die Pigmente der Chorioidea und der Haare. Arch. f. exper. Pathol. und Pharmak., **20.

***) Eugen Hirschfeld, Untersuchungen über die schwarzen Farbstoffe der Chorioidea und verwandte Pigmente. Zeitschrift. f. physiol. Chemie, **13**, 414.

†) Landolt, Über das Melanin der Augenhäute, ibid. **28**, 407.

Nencki*) aus melanotischen Geschwülsten des Menschen dargestellte und von ihnen als Phymatorhusin bezeichnete Pigmentkörper, da derselbe trotz hohen Schwefelgehaltes ganz abweichende chemische und physikalische Eigenschaften aufweist.

Dasselbe gilt von dem von denselben Autoren**) dargestellten „Hippomelanin". Es ist dies ein Pigment, welches sie aus den bei Pferden so häufig beobachteten melanotischen Tumoren isoliert haben. Es unterscheidet sich nicht nur durch einen vielfach geringeren Schwefelgehalt von dem Phymatorhusin, sondern weist auch wesentliche Unterschiede von unserem Pigment auf.

Der Erste, welcher normales melanotisches Pigment vom Menschen chemisch zu gewinnen suchte, scheint, wie bereits erwähnt, F. P. Floyd***) gewesen zu sein, doch sind seine Resultate für uns nicht verwendbar, weil er das Pigment nicht von den zelligen Bestandteilen trennte. Wichtig ist hingegen die Arbeit von John J. Abel und Walter S. Davis†), welche das Pigment aus der Haut und den Haaren des Negers darstellten. Sie fanden:

Für Pigment der Epidermis	der Haare
C 51,83 Proz.	52,74 Proz.
H 3,86 „	3,53 „
N 17,01 „	10,51 „
O 26,70 „	29,88 „

Nach Behandlung des Pigments mit Kali fanden sie hingegen

Hautpigment	Haarpigment
C 53,56 Proz.	57,06 Proz.
H 5,11 „	5,45 „
N 15,47 „	12,87 „
S 2,53 „	1,77 „
O 23,33 „	22,85 „

Doch glauben die genannten Autoren selbst, kein konstantes Präparat in Händen gehabt zu haben, sondern ein Gemenge von wechselnder Zusammensetzung. Meine Präparate hingegen gaben auch nach Behandlung mit eingreifenden Reagentien (konzentrierte H_2SO_4) konstante Zahlen. Eisen fanden sie nur in Spuren, in der Asche vornehmlich Kieselsäure. Ferner sei noch die Arbeit von

---

*) J. Berdez und M. Nencki, Über die Farbstoffe der melanotischen Sarkome. Arch. f. exp. Pharmakologie und Pathologie, **20**, 346.

**) L. c.

***) F. P. Floyd, l. c.; und Chemical News, 1876, **34**, 179.

†) John J. Abel and Walter S. Davis, on the pigment of the Negro's Skin and Hair, Journal of experimental medicine, **1**, 361.

Walther Jones und John Auer*) erwähnt, welche das Pigment aus schwarzen Roßhaaren der Oxydation in alkalischer Lösung unterzogen und zu Oxalsäure gelangten, während sie aus dem Pigmentkörper selbst durch abwechselnde Behandlung mit Kali und Salzsäure zu einem schwefelfreien Körper gelangten, der die Eigenschaften der Melaninsäuren zeigt.

Leo v. Zumbusch**) untersuchte das Sarkomelanin (aus melanotischen Tumoren) vom Menschen und fand es folgendermaßen zusammengesetzt:

C 51,68 Proz., H 6,46 Proz., N 14,56 Proz., S 1,74 Proz., Fe 0,47 Proz. Die Asche betrug 18,726 Proz. und bestand aus Kieselsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure und bedeutenden Mengen Calcium.

Experimentelles.

1. Pigmentsäure aus schwarzem Roßhaar.

Fünf Kilo schwarzes Roßhaar wurden zunächst mit $^1/_2$-proz. Na_2CO_3 Lösung gewaschen, sodann mit 25 Liter einer 5-proz. Kalilauge bis zur völligen Lösung gekocht, was etwa 4 Stunden beansprucht. Nach erfolgter Lösung, wobei reichlich H_2S und NH_3 entweicht, wird die erkaltete schwarzbraune Flüssigkeit mit einem sehr großen Überschuß von konzentrierter Salzsäure versetzt. Hierbei scheidet sich unter heftiger Gasentwickelung eine teigige Masse aus, die rasch auf den Boden des Gefäßes sinkt. Dieselbe wird am besten mittels eines Koliertuches von der dunklen Flüssigkeit getrennt. Hierauf wird sie mit destilliertem Wasser und verdünnter Salzsäure gut ausgewaschen und mit 5-proz. Salzsäure in einem Kolben am Sandbade unter dem Rückflußkühler 8 Stunden gekocht, um so die letzten Reste etwa noch anhaftender Eiweißkörper zu entfernen. Dabei scheidet sich ein sehr feines braunes Pulver aus, welches heiß abfiltriert und dann in einer Schale am Wasserbade getrocknet wird. Das Letztere ist zwar nicht unbedingt notwendig, es erleichtert aber wesentlich die nächsten Manipulationen. Die Substanz wird nunmehr mit konzentriertem, wässrigem Ammoniak in einer Reibschale verrieben, abfiltriert, das Filtrat mit Salzsäure gefällt, der Pigmentkörper abfiltriert, gut gewaschen und dieselbe Prozedur wiederholt. Die so dargestellte Substanz wird zuerst am Wasserbade, schließlich im Toluolbade getrocknet und im Achatmörser zu feinstem Pulver verrieben. Behufs weiterer Reinigung dieses Körpers wurde derselbe durch Verreiben mit konzentrierter H_2SO_4, wie dies bereits Nencki angegeben hat, gelöst, wobei sich etwas SO_2 entwickelt. Es wird über Glaswolle an der Pumpe filtriert; die Lösung wird sodann in viel kaltes destilliertes Wasser gegossen, worauf das Pigment sich wieder als feines Pulver abscheidet. Es wird filtriert und so lange gewaschen, bis das Waschwasser keine Schwefelsäurereaktion mehr gibt. Das Pulver wird getrocknet und diese Prozedur noch einmal wiederholt. Das Präparat eignet sich in diesem Zustande noch nicht zur Analyse. Es enthält nämlich infolge seiner

---

*) The amer. Journal of Physiology, **5**, 321.

) Zeitschrift f. physiol. Chemie, **36, 521.

Darstellungsweise elementaren Schwefel, worauf die bisherigen Untersucher nicht geachtet zu haben scheinen, und liefert viel zu hohe und naturgemäß inkonstante Schwefelzahlen. Das vorerst mit Alkohol gewaschene Präparat wird deshalb mit reinem Schwefelkohlenstoff und rasch nach diesem mit Äther ausgewaschen.

Eigenschaften und Zusammensetzung der Pigmentsäure aus schwarzem Roßhaar.

Schwarzbraunes Pulver, unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln, leicht löslich in Ammoniak und den fixen Alkalien, löslich in konz. Schwefelsäure in der Kälte, unlöslich in verdünnten Säuren. Besitzt keinen Schmelzpunkt, versintert vielmehr allmählich beim Erhitzen. Mit Zinkstaub erhitzt gibt es Pyrrolreaktion und mit Chromsäure in Eisessig gelöst ein Oxydationsprodukt, welches weiter besprochen wird.

Elementaranalysen:

Aschegehalt 9,80 Proz.

0,1580 gaben 0,3143 CO_2 und 0,0762 H_2O, entsprechend 54,26 Proz. C und 5,36 Proz. H. Auf aschefreie Substanz berechnet 59,49 Proz. C und 5,87 Proz. H.

0,1664 g gaben 0,3340 CO_2 und 0,0801 g H_2O, entsprechend 54,74 g C und 5,34 Proz. H. Auf aschefreie Substanz berechnet 60,02 Proz. C. und 5,91 Proz. H.

0,1824 g gaben nach Dumas bei 19° C und 760 mm 16,2 ccm, entsprechend 10,21 Proz. N, aschefrei 11,18 Proz. N.

0,1730 g gaben nach Dumas bei 21° C und 758 mm 14,80 ccm N, entsprechend 9,70 Proz. N, aschefrei 10,64 Proz. N.

0,5770 g gaben nach Liebig 0,1304 g $BaSO_4$, entsprechend 3,10 Proz. S, aschefrei 3,43 Proz. S.

Die Asche bestand aus Kieselsäure und Spuren von Eisen.

Analysentabelle	C	H	N	S
Gefunden	59,49	5,87	11,18	3,43
	60,02	5,91	10,64	
Berechnet für $C_{50}H_{58}N_8SO_{12}$	60,36	5,80	11,26	3,22

2. Pigmentsäure des Schimmelhaares.

Der Darstellungsprozeß ist im großen und ganzen derselbe, wie er beim schwarzen Roßhaare geschildert wurde; doch ergab sich hier die Notwendigkeit einiger Abänderungen. Als ich nämlich das Pigmentpulver aus Schimmelhaar nach dem Kochen mit 5-proz. Salzsäure in Ammoniak löste, zeigte es sich zu meiner großen Überraschung, daß die Substanz hierbei ganz schwarz wurde. Das Ammoniak tritt offenbar

hier als farbstoffbildende Komponente in den hellen Pigmentkörper ein. Ob der hierbei entstehende dunkle Körper identisch ist mit dem Pigmentkörper aus dem schwarzen Roßhaar, kann erst durch Untersuchungen, über die ich bald berichten zu können hoffe, festgestellt werden. Hingegen gelang die weitere Reinigung leicht durch Auflösung in konzentrierter Schwefelsäure in der Kälte und Fällung durch Eingießen in viel kaltes destilliertes Wasser, was zweimal wiederholt wurde in gleicher Weise, wie dies beim Pigment aus schwarzem Roßhaar angegeben worden ist.

Es resultiert auf diese Weise schließlich ein helles graubraunes Pulver, welches die Pigmentsäure aus Schimmelhaar darstellt. Daß dasselbe nicht vollkommen weiß ist, kann in Anbetracht dessen, daß ja auch das Schimmelhaar nie ganz weiß ist, sondern immer mehr oder minder eine graue, mitunter auch gelbliche Nuance zeigt, nicht wundernehmen. Die Farbe wird noch durch die Eingriffe der verschiedenen chemischen Agentien beeinflußt, denn wir konnten beobachten, daß die Substanz gelöst in konzentrierter Schwefelsäure unmittelbar nach dem Eingießen in das destillierte Wasser nahezu weiß erschien; nach längerem Stehen nahm dieselbe nach und nach eine dunklere Färbung an. Die chemische Zusammensetzung weicht um ein geringes im Kohlenstoff und Wasserstoff vom Pigmentkörper aus dem schwarzen Roßhaar ab. Auffallend ist jedoch der nahezu doppelt so große Aschegehalt dieses Körpers gegenüber dem erstbeschriebenen.

Analysen der Pigmentsäure aus Schimmelhaaren.

Aschegehalt 16,28 Proz.

0,1814 g gaben 0,2742 g CO_2 und 0,0979 H_2O, entspr. 40,63 Proz. C und 5,90 Proz. H, aschefrei 48,53 Proz. C und 7,04 Proz. H.

0,1583 g gaben 0,2357 CO_2 und 0,0842 H_2O, entspr. 40,60 Proz. C und 5,91 Proz. H, aschefrei 48,51 Proz. C und 7,06 Proz. H.

0,1964 g gaben nach Dumas bei 20° C und 758 mm 18,33 ccm N, entspr. 10,63 Proz. N, aschefrei 12,69 Proz. N.

0,1664 gaben nach Dumas bei 21° C und 750 mm 15,61 ccm N, entspr. 10,53 Proz. N, aschefrei 12,58 Proz. N.

0,5690 gaben nach Liebig 0,0974 $BaSO_4$, entspr. 2,35 Proz. S, aschefrei 2,80 Proz. S.

Analysentabelle	C	H	N	S
Gefunden	48,53 48,51	7,04 7,06	12,69 12,58	2,80
Berechnet für $C_{45}H_{78}N_{10}SO_{20}$	48,64	7,02	12,61	2,88

Es erschien nun von großem Interesse, die Untersuchungen auf die Pigmente anderer Tiere auszudehnen und auch da das schwarze und weiße Pigment zu vergleichen.

3. Pigmentsäure aus schwarzer Schafwolle.

Behufs Darstellung und Reinigung befolgte ich die beim schwarzen Roßhaare verwendete und oben beschriebene Methode. Als Ausgangsmaterial diente naturschwarze Wolle.

Tiefschwarzes Pulver.

Aschegehalt 10,85 Proz.

0,1630 g Substanz gaben 0,2718 g CO_2 und 0,0796 H_2O, entspr. 45,47 Proz. C und 5,47 Proz. H, aschefrei 51,00 Proz. C und 6,13 Proz. H.

0,1662 g gaben 0,2766 CO_2 und 0,0817 H_2O, entspr. 45,39 Proz. C und 5,46 Proz. H, aschefrei 50,91 Proz. C und 6,15 Proz. H.

0,1662 g gaben nach Dumas bei 21° C und 752 mm B 13,6 ccm N, entspr. 9,22 Proz. N, aschefrei 10,34 Proz. N.

0,1842 g gaben nach Dumas bei 19° C und 750 mm 14,8 ccm N, entspr. 9,11 Proz. N, aschefrei 10,21 Proz. N.

0,5830 g gaben nach Liebig 0,1040 g $BaSO_4$, entspr. 2,60 Proz. S, aschefrei 2,91 Proz. S.

Analysentabelle	C	H	N	S
Gefunden	51,00 50,91	6,13 6,15	10,34 10,21	2,91
Berechnet für $C_{46}H_{68}N_8SO_{20}$	50,92	6,27	10,33	2,95

Darstellung der Pigmentsäure aus weißer Schafwolle.

Der Vorgang bei der Darstellung der Farbsäure aus weißer, ungebleichter und auch sonst nicht künstlich appretierter Schafwolle ist genau derselbe wie bei der schwarzen Wolle und beim schwarzen Roßhaare, nur hat hier das Behandeln mit NH_3 zu entfallen, weil analog wie beim Schimmelpigment eine dunkle Färbung eintritt.

Die Pigmentsäure aus weißer Schafwolle ist ein hellgraues Pulver folgender Zusammensetzung:

Aschegehalt 2,30 Proz.

0,1620 g gaben 0,3218 CO_2 und 0,1052 H_2O, entsprechend 54,18 Proz. C und 7,21 Proz. H, aschefrei 55,45 Proz. C und 7,38 Proz. H.

0,1883 g gaben 0,3720 g CO_2 und 0,1225 H_2O, entsprechend 53,93 Proz. C und 7,22 Proz. H, aschefrei 55,20 Proz. C und 7,40 Proz. H.

0,1677 g gaben nach Dumas bei 21° C und 748 mm B 15,8 ccm N, entsprechend 10,37 Proz. N, aschefrei 10,62 Proz. N.

0,1448 g gaben nach Dumas bei 18° C und 751 mm B 13,50 ccm N, entsprechend 10,62 Proz. N, aschefrei 10,87 Proz. N.
0,6024 g gaben nach Liebig 0,0998 $BaSO_4$, entsprechend 2,25 Proz. S, aschefrei 2,30 Proz. S.

Analysentabelle	C	H	N	S
Gefunden	55,45 55,20	7,38 7,40	10,62 10,87	2,30
Berechnet für $C_{61}H_{98}N_{10}SO_{20}$	55,37	7,41	10,59	2,42

Die bisher von verschiedenen Forschern dargestellten Pigment-Präparate können auch nicht annähernd den Anspruch auf Analysenreinheit erheben, und es wären Schlüsse aus den Verhältniszahlen zwischen C : H : N : S als durchaus verfrüht zu betrachten. Jedenfalls muß der Analyse eine Reinigung durch Auflösen in konzentrierter Schwefelsäure vorausgehen. Die bisher vorliegenden Schwefelwerte der natürlichen Pigmente aus Haaren oder Haut sind wohl alle unrichtig, da keiner von meinen Vorgängern über das Vorkommen von elementarem Schwefel in den Präparaten berichtet, und da die Reinigung mittelst Schwefelkohlenstoff unterlassen wurde.

Die von mir dargestellten Präparate entsprechen den hier aufgestellten Bedingungen, es ist auch aus den Analysen ersichtlich, daß sie durchaus andere Verhältniszahlen ergeben, als sie von den früheren Autoren angegeben werden, und daß sie zu wesentlich niedrigeren und einfacheren Formeln führen.

Der schwarze Pigmentkörper mit der einfachsten Formel $C_{50}H_{58}N_8SO_{12}$ und der helle Pigmentkörper $C_{45}H_{78}N_{10}SO_{20}$ unterscheiden sich, wie die analytischen Belege zeigen, nur um ein geringes; es ist sehr wahrscheinlich, daß sie im Kerne identisch sind und daß die verschiedene Färbung lediglich durch Eintritt einer chromogenen Gruppe in denselben bedingt wird. Sehr ins Auge fallend ist der große Unterschied im Wasserstoffgehalt wie im Sauerstoffgehalt; der helle Pigmentkörper enthält viel mehr Wasserstoff, Sauerstoff und auch Stickstoff, während er kohlenstoffärmer ist als die schwarze Farbsäure. Der helle Pigmentkörper ist gleichsam zugleich Oxydations- und Reduktionsprodukt des dunklen. Auf die Zulässigkeit einer solchen Annahme werden wir dadurch gebracht, daß ja das helle Pigment durch Hinzutritt von NH_3 schwarz wird. Bewiesen wird übrigens die genetische Identität durch eine beiden Substanzen gemeinsame Gruppierung, welche zu einem identischen Oxydationsprodukt führt.

Mutmaßlicher Ursprung des Pigmentes.

Für die Entstehung des Pigmentes innerhalb des Organismus bestehen, wie eingangs auseinandergesetzt, verschiedene Möglichkeiten. Die naheliegendste schien wegen der Färbung des dunklen Pigmentes, und dies hat unter anderen wohl die meisten Histologen bestochen, die, daß das Pigment aus der farbigen Komponente des Hämoglobins entstanden sei. Unterstützt wurde diese Meinung dadurch, daß das Pigment im Embryo erst mit dem Auftreten des Blutes sichtbar wird, ferner dadurch, daß man das Pigment so häufig in unmittelbarer Nähe der Blutgefäße findet — daher das emsige Suchen nach Eisen in den verschiedenen Pigmenten, wiewohl man ja in dem Hämatoporphyrin einen eisenfreien Blutfarbstoff gefunden hatte. Dies beweist, daß der Eisengehalt oder Eisenmangel mit der Provenienz aus dem Blute nichts zu tun hat. Es ist ja bekannt, daß die Gallenfarbstoffe aus dem Blutfarbstoffe stammen und daß wir schließlich von dem Hämatin aus zu ungefärbten Oxydationsprodukten und Reduktionsprodukten gelangen können.

Es war daher festzustellen, ob man nicht aus dem Blutfarbstoffe und dem Pigmente identische oder chemisch verwandte Derivate herstellen könne.

Nach dieser Richtung war der Weg insofern vorgezeichnet, als in letzter Zeit einerseits durch Zaleski und Nencki*), andererseits durch Küster**) charakteristische Derivate des Blutfarbstoffes gefunden worden waren.

Zaleski und Nencki erhielten bei der Reduktion und Spaltung von Acethämin mit Jodwasserstoff von hoher Konzentration (2.0 Sp. G.) und Jodphosphonium ein destillierbares Produkt, das Hämopyrrol, welches wahrscheinlich ein Methylpropylpyrrol ist. Andererseits fand Küster bei der Oxydation von Hämatin mit Eisessig und Chromsäure ätherlösliche Säuren — die Hämatinsäuren, von denen eine $C_8H_9O_4N$ wahrscheinlich zu Fittigs Methyl-Äthylmaleinsäure in Beziehung steht.

Ist nun das dunkle Pigment ein Derivat des Blutfarbstoffes, oder beteiligt sich auch nur der Blutfarbstoff an der Bildung desselben, so mußte man bei entsprechender Behandlung des Pigmentes entweder Hämopyrrol oder eine Hämatinsäure erhalten.

*) Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft. Jahrgang 34, S. 997.

) Zeitschr. f. phys. Chemie. **28, 1, **29**, 185, Liebigs Annalen. **350**, 186.

Versuch der Darstellung von Hämopyrrol aus schwarzem Pigment.

5 g Pigment werden in 250 g Eisessig suspendiert, 200 g Jodwasserstoff vom Sp. G. 2,0 und 50 g Jodphosphonium, letzteres successive hinzugefügt; das Ganze wird am Steigrohr im Wasserbad $^1/_2$ Stunde lang erhitzt. Anscheinend trat hierbei keine Reaktion ein, das Pigment blieb vielmehr fast ganz ungelöst. Es wurde die Hauptmasse der Säure mit Kali abgestumpft und bei noch schwach saurer Reaktion abdestilliert. Zum Schluß wurde noch bei alkalischer Reaktion destilliert. Aber weder aus dem alkalischen noch aus dem sauren Anteil ging Hämopyrrol über, was durch den negativen Ausfall der Pyrrolreaktion festgestellt wurde. Das Destillat gab weder eine Pyrrolreaktion noch eine Fällung mit Sublimat, noch auch eine Fällung mit Pikrinsäure.

Es erschien wohl nach diesem negativen Ergebnis ganz unwahrscheinlich, daß im Pigment Hämopyrrol $C_8H_{13}N$, welches das einfachste aus Hämatin darstellbare Ringsystem darstellt, vorhanden ist, und da die Küstersche Hämatinsäure (Methyl-Äthylmaleinsäureimid) $C_8H_9O_4N$ aus Hämopyrrol durch Oxydation mit Chromsäure entsteht (Berl. Ber. 35, 2954), so war von vornherein nicht anzunehmen, daß man bei Oxydation mit Chromsäure zur Hämatinsäure gelangen würde. Tatsächlich hat sich diese Voraussetzung bestätigt, aber Oxydationsversuche mit Pigment führten zu einer neuen Substanz, welche gleichmäßig aus den Farbsäuren aus Schimmelhaar, schwarzem Roßhaar, weißer und schwarzer Schafwolle erhalten wurde und ein Licht auf den Aufbau des Pigmentes zu werfen geeignet ist, da alle bisher von mir untersuchten Pigmente die gleiche Verbindung in guter Ausbeute liefern.

Oxydationsprodukt.

Läßt man den schwarzen Pigmentkörper mit Schwefelsäure und chromsaurem Kali in der Kälte stehen, so bemerkt man schon nach kurzer Zeit die Umwandlung desselben in einen weißen krystallinischen Körper. Diese Umwandlung nimmt bei längerem Stehen immer mehr zu. Dieser Vorgang ist verbunden mit geringer Gasentwickelung. Um dieses Oxydationsprodukt in größerer Menge zu gewinnen, hat sich nach verschiedenen Versuchen folgende Vorschrift am besten bewährt.

20 g des Pigmentkörpers werden allmählich in 250 ccm einer warmen 18—20-proz. Chromsäurelösung (hergestellt aus $K_2Cr_2O_7$ und H_2SO_4) unter fortwährendem Umschütteln eingetragen. Die Reaktion ist eine ziemlich lebhafte und geht unter reichlicher Entwickelung von Gas vor sich. Dieses wurde nicht näher untersucht, schien aber aus Kohlensäure und Stickstoff zu bestehen. Es empfiehlt sich daher, das Ablaufen der Hauptreaktion jedesmal abzuwarten, ehe man neuerdings von der Substanz zusetzt.

Ist alles eingetragen, so stellt man das Gemenge noch auf $2^1/_2$ Stunden auf das Wasserbad. Man verdünnt sodann mit destilliertem Wasser und filtriert wegen des niedrigen Schmelzpunktes des Oxydationsproduktes erst nach dem Erkalten ab und wäscht, bis keine Spur Chrom mehr vorhanden ist. Der Niederschlag wird auf dem Tonteller getrocknet. Derselbe enthält Schwefel, sehr viel Kieselsäure und das Oxydationsprodukt. Die Farbe dieses Gemenges ist gelblichweiß. Die Substanz wird mit etwas Eisessig gekocht und heiß filtriert. Hierbei geht das Oxydationsprodukt sowie Spuren von Schwefel und Kieselsäure in Lösung, während der weitaus größte Teil von Kieselsäure und Schwefel sowie eventuelle Reste unoxydierter Substanz auf dem Filter zurückbleiben.

Nach Erkalten der Lösung scheiden sich die gelöst gewesenen Spuren von Schwefel und Kieselsäure ab, während das Oxydationsprodukt auch in der Kälte in Lösung bleibt. Letzteres wird aus derselben durch Zusatz von destilliertem Wasser gefällt und 5—6 Stunden ruhig stehen gelassen. Dies ist deshalb notwendig, weil der Niederschlag so fein verteilt ausfällt, daß er das Filter passieren würde. Nach dem Absetzen wird auf der Pumpe abgesaugt, was aus oben genanntem Grunde noch immer mit Schwierigkeiten verbunden ist. Der Niederschlag wird von der Essigsäure durch Auswaschen befreit, in der Kälte getrocknet, zweimal aus Aceton und schließlich aus absolutem Alkohol bis zum konstanten Schmelzpunkt von 68° umkrystallisiert.

Die Untersuchung ergab die Abwesenheit von Schwefel und Stickstoff. Der Körper stellt schneeweiße kleine Nadeln dar, die in Wasser unlöslich, in allen übrigen Lösungsmitteln löslich sind. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

1. 0,1860 g Substanz gaben 0,4850 g CO_2 und 0,2000 g H_2O.
2. 0,1660 g „ „ 0,4330 g CO_2 und 0,1800 g H_2O.

Diese Zahlen entsprechen der Formel: $C_{11}H_{22}O_2$.

Berechnet		Gefunden I	Gefunden II
Proz. C 70,96	Proz. C	71,07	71,14
H 11,82	„ H	11,94	12,04

Der Schmelzpunkt ergab sich zu 68° C. Der Siedepunkt unkorr. zu 256°—258° C.

Die Analyse der Substanz sowie ihre Löslichkeitsverhältnisse, Schmelz- und Siedepunkt stimmen ganz überein mit einer von Butlerow beschriebenen Methyldibutylessigsäure $C_{11}H_{22}O_2$, welche ihrer Entstehung nach als 2 . 2 . 3 . 4 . 4. Pentamethylpentan-3-carbonsäure $CH_3 . C[C(CH_3)_2]_2 COOH$ anzusehen ist. Butlerow beschreibt sie (Journal d. russ. chem. Gesellsch. 11, 203) als krystallinische Masse, mit Wasserdampf destillierbar. Die frisch erstarrte Säure schmilzt bei 66—70°, siedet unzersetzt bei 260° (korr.), ist unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und Äther. Butlerow erhielt sie bei Oxydation von Isotributylen mit Chrom-

säuregemisch in der Kälte. Isotributylen ist nun ein Duodekylen der Formel:

$$C_{12}H_{24} = (CH_3)_2 . C : C(C[CH_3]_3)_2 \text{ oder } \begin{array}{ccccccc} & & & CH_3\ CH_3 & & & \\ & & & \diagdown\diagup & & & \\ CH_3 & \diagdown & & C & & \diagup & CH_3 \\ & & & \| & & & \\ CH_3 & - & C - & C & - C & - & CH_3 \\ CH_3 & \diagup & & & & \diagdown & CH_3 \end{array}$$

Da ich die Methyldibutylessigsäure nach dem gleichen Oydationsverfahren aus Pigment erhalte, wie Butlerow aus Isotributylen, so wird man wohl annehmen können, daß bei dem Oxydationsvorgang aus einem hydroaromatischen Kohlenwasserstoffkern durch Ringsprengung Isotributylen und weiterhin Methyldibutylessigsäure entstanden ist.

Ich bin nun mit dem Studium der weiteren Oxydationsprodukte, sowie des Reduktionsproduktes der Pigmente beschäftigt.

* *
*

Durch die vorliegende Untersuchung ist wohl der sichere Nachweis erbracht, daß an dem hämatogenen Ursprung des Haarpigmentes nicht weiter festgehalten werden kann. Während die histologischen Untersuchungen keine entscheidende Aufklärung bringen können, gelingt die Lösung des Problems auf chemischem Wege. Sie zeigt, daß aus dem Pigment der Haare nach sorgfältiger Reinigung keines von den tiefen Abbauprodukten der färbenden Komponente des Hämoglobins erhalten werden kann. Es erscheint daher eine Entstehung aus dem Hämatin ausgeschlossen. Außerdem ist hier zum erstenmale die Existenz eines „weißen Chromogens“ festgestellt, welches die Ursache der weißen Farbe der weißen Schafwolle und des Schimmelhaares ist, was, wie bekannt, bisher anders gedeutet wurde, und es sind ferner die nahen chemischen Beziehungen des weißen Chromogens zu den bunten Farbsäuren demonstriert worden.

Wir müssen nun die anderen Möglichkeiten der Entstehung von Pigment erörtern. In den geistreichen Ausführungen in Samuelys Arbeit über künstliche Melanine aus Hofmeisters Laboratorium*) werden bei der Annahme einer etwaigen Entstehung von Pigment aus Eiweiß zur Erklärung 1. die skatolbildenden Gruppen, 2. die tyrosingebenden Gruppen, 3. pyrrolbildende Gruppen und 4. pyridingebende Gruppen des Eiweißmoleküls

*) Hofmeisters Beiträge. Bd. 2.

herangezogen. So interessant diese theoretischen Voraussetzungen sind, so können sie doch vorläufig nur wenig zur Aufklärung der Konstitution des natürlichen Pigmentes beitragen, solange nicht die Erforschung der Abbauprodukte des Pigmentes eine sichere Grundlage zu Spekulationen über die vom Organismus zum Aufbau des Pigmentes verwendeten, im Eiweiß oder in anderen Körperbestandteilen vorgebildeten Gruppen gegeben hat. Die gewiß sehr merkwürdige Bildung von Melanoidinen bei der Hydrolyse von Eiweißsubstanzen durch Säure, die entschieden als Kondensationsvorgang aufzufassen ist, kann nicht direkt zur Erklärung der Bildung von Pigment im Organismus oder zur Aufklärung des Aufbaues natürlicher Pigmente herangezogen werden. Schmiedeberg*), der konstatieren konnte, daß von den vielen untersuchten pathologischen und normalen Melaninen nicht zwei die gleiche Zusammensetzung haben, zieht zur Erklärung dieser Befunde die Anschauung heran, daß das Material zur Bildung der Melanine nicht die genuinen Eiweißstoffe unmittelbar darstellen, sondern nur Spaltungsprodukte derselben und dies unter sehr variierenden Verhältnissen. Dies würde die bald äußerst reichliche, bald verschwindend geringe Pigmentbildung erklären, die unter generellen und individuellen, sowie unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen so außerordentlich großen Schwankungen unterliegt.

Erst eine vergleichende Untersuchung der künstlichen Melanine (Melanoidine nach Schmiedeberg) mit den natürlichen Pigmenten in Bezug auf ihre Abbauprodukte wird Klarheit in die Frage bringen, ob die Entstehungsbedingungen für beide eine Parallele zulassen oder ob es sich nur um gleichgefärbte Substanzen handelt. Die Natur des Pigmentes selbst aber kann nur durch das Studium der näheren Abbauprodukte erschlossen werden, für die uns vielleicht theoretische Betrachtungen, wie die von Samuely, Fingerzeige bieten. Auffällig ist nur, daß Samuely bei Oxydation von Melanoidin unter gleichen Bedingungen wie ich sie eingehalten, nicht auf die Methyldibutylessigsäure gestoßen ist. Er erhielt zwar im Ätherextrakt eine äußerst geringe Menge feiner Nadeln, die sauer reagierten, über deren Natur er jedoch nichts aussagt. Da über die Menge des verwendeten Ausgangsmateriales nichts berichtet wird, erscheint es notwendig, Melanoidin mit Melanin in bezug auf die Bildung des einzigen gegenwärtig bekannten charakteristischen Derivats des Haarpigments, die Methyldibutylessigsäure, zu vergleichen.

*) Arch. f. exp. Path. und Pharm. 39, 1—84.

Die Entstehung von Pyridin aus Melanoidin bei Reduktion mit Jodwasserstoffsäure und Phosphoniumjodid, wie sie Samuely beobachtet, findet beim natürlichen Melanin keine Parallele.

Zum Schlusse sei noch die Bemerkung gemacht, daß die durch alkalische Aufspaltung gewonnenen Pigmente als Farbsäuren anzusehen sind, die sich von dem natürlichen Pigment ableiten. Durch Säurehydrolyse der Keratinsubstanzen, welche das Pigment einschließen, erhält man anders und jedenfalls höher zusammengesetzte Pigmente; mit dem vergleichenden Studium dieser Substanzen, sowie mit der Überführung des Pigmentes in die Farbsäure bleibe ich beschäftigt.

V.

Über Hemmungen der Präzipitinreaktion.

Von Dr. **Leonor Michaelis,**

Assistent an der 1. medizin. Klinik der kgl. Charité in Berlin.

Aus dem tierphysiologischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin. (Direktor: Prof. Dr. Zuntz.)

In einer früheren Mitteilung (10) hatte ich mich mit den Eigenschaften des auf 68° erhitzten Präzipitins beschäftigt und angegeben, daß dieses durch die Hitze „inaktivierte“ Präzipitin durch Hinzufügung einer relativ kleinen, an sich wenig wirksamen Dosis von unerhitztem Präzipitin in seiner Wirksamkeit auf die eingestellte Eiweißart regeneriert wird. Was zunächst diese Tatsache anbetrifft, so konnte ich sie unter gleichen Bedingungen wieder bestätigen. Jedoch habe ich mich durch die weiter fortgesetzten Versuche überzeugt, daß die Deutung, welche ich vorläufig für diese Erscheinung zu geben versuchte, sich nicht mit fernerhin festgestellten Tatsachen vereinigen läßt. Ich hatte nämlich versucht, den Präzipitinen eine ähnliche Doppelnatur zuzuschreiben, wie sie nach den bekannten Untersuchungen von Bordet und Ehrlich und Morgenroth den Hämolysinen zukommt, und geglaubt, auch die Präzipitine in zwei Substanzen auflösen zu können, welche dem Ambozeptor und dem Komplement der Hämolysine entsprechen, mit dem Unterschied, daß dieses Komplement nicht in jedem normalen Serum, sondern nur in dem Serum der vorbehandelten Tiere vorhanden sei. Diese Deutung also ist es, welche sich als unzutreffend erwiesen hat, indem ich bei der Fortsetzung der Versuche auf eine bisher nicht beachtete Fehlerquelle stieß.

Die Tatsache an sich möge durch ein Beispiel (Tabelle I) erläutert werden.

Tabelle I.

	a	b	c	d	e	f
Ziegenserum	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
15′ auf 68° erhitztes Präzipitin		0,5		1,0	1,0	1,0
Nicht erhitztes Präzipitin	0,5	0,5	1,0	0,5		
Isoton. Wasser	0,5				0,5	0,8
Resultat nach 16 Stunden (+ bedeutet sedimentierter Niederschlag).	+	++	++	+++	0 etwas trübe, aber nur opaleszent ohne Flokken oder Sediment	0
Resultat nach 36 Stunden	+	++	++	+++	++	0

Man beachte zunächst nur das Resultat, wie es 16 Stunden nach Ansetzung des Versuchs ausgefallen ist. Dann wird man in der Tat finden, daß eine an sich unwirksame, d. h. nicht zur Absetzung eines Niederschlages führende Menge von erhitztem Präzipitin (Tab. I, e) durch Hinzufügen einer an sich nur wenig wirkenden Menge von unerhitztem Präzipitin in seiner Wirkung derart regeneriert wird, daß die Menge des nunmehr entstehenden Niederschlages durch das unerhitzte Präzipitin allein nicht erklärt werden kann. (b, d.)

Wenn man aber diesen Versuch in einem kühlen Raum stehen läßt und nach weiteren 24 Stunden wieder beobachtet, so hat sich das Resultat verändert. Während nämlich gleichzeitig angesetzte Kontrollröhrchen von einfachem Serum zeigen, daß bei dieser Aufbewahrung spontan keine Niederschläge entstehen, sieht man im Gegenteil, daß jetzt das scheinbar durch das Erhitzen unwirksam

gewordene Präzipitin schließlich doch einen Niederschlag erzeugt hat. Dieses Ergebnis ist ganz konstant, nur daß die Zeitdauer, innerhalb deren sich dieser Niederschlag absetzt, je nach dem Grade und der Dauer der vorangegangenen Erhitzung schwankt. So kann man auch durch abgestuftes Erhitzen erreichen, daß der Niederschlag beliebig früher oder später entsteht, und durch dieses abgestufte Erhitzen kann man eine vollständige Reihe von Präzipitinen mit verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten bekommen. Diese erhitzten Präzipitine wirken auf den eingestellten Eiweißkörper derart, daß einige Zeit nach dem Vermischen eine völlig homogene Opazität entsteht, in welcher auch nicht andeutungsweise ein Flöckchen zu sehen ist. Nach langem Stehen beginnt dann, ganz allmählich fortschreitend, die Absetzung eines flockigen Niederschlages.

Tabelle II.

	10fach verdünnt			
	5 Min. auf 69—70° erhitztes Präz.	10 Min. auf 69° erhitztes Präz.	20 Min. auf 69° erhitztes Präz.	30 Min. auf 69° erhitztes Präz.
	0,5	0,5	0,5	0,5
Ziegenalbumin	0,1	0,1	0,1	0,1
Resultat nach 1 Std.	grobe Flocken	leicht trüb	minimale Trübung	0
Resultat nach 3 Std.	**gut abgesetzt**	grobe Flocken	feinste Flocken	fast 0
Resultat nach 4 Std.	ebenso	**gut abgesetzt**	gröbere Flocken	feinste Flocken
Resultat nach 24 Std.	ebenso	ebenso	**gut abgesetzt**	**abgesetzt**

Diese Tabelle zeigt eine solche Reihe, in der durch verschieden ausgedehntes Erhitzen die Reaktionsgeschwindigkeit verschieden stark vermindert worden ist.

Man könnte nun fragen, ob diese langsam entstehenden Niederschläge ihrem Wesen nach identisch sind mit den rasch ausfallenden, oder ob sie nachweisbare Unterschiede zeigen. Das Charakteristischste der Niederschläge scheint mir ihre Eigenschaft zu sein, sich in sehr verdünnten Säuren oder Alkalien zu lösen

und beim Neutralisieren zum Teil wieder auszufallen. Diese Eigenschaft zeigen die langsam entstehenden Niederschläge in gleicher Weise wie die rasch entstehenden. Der Vorsicht halber will ich noch hinzufügen, daß bakterielle Trübungen selbstverständlich ausgeschlossen wurden.

Ich hatte nun früher das auf 68—70° erhitzte Serum als „inaktiviert" betrachtet, wenn es in der sonst bei der Präzipitinreaktion völlig ausreichenden Zeit von 2 Stunden keinen Niederschlag erzeugt hatte. Nach dem soeben Auseinandergesetzten ist es klar, daß hier die Fehlerquelle lag. Wenn man beträchtlich länger zuwartet, so erweist sich eben jenes scheinbar unwirksam gewordene Präzipitin doch noch als wirksam, und zwar derart, daß der definitiv entstandene Niederschlag kaum hinter dem durch unerhitztes Präzipitin erzeugten Niederschlag an Volumen zurücksteht, wobei jedoch nicht zu vergessen ist, daß ein sich so langsam senkender Niederschlag sehr wenig dicht ist und eine unverhältnismäßig große Masse vortäuscht. Der Sicherheit halber möchte ich noch einmal bemerken, daß selbstverständlich stets Kontrollversuche angestellt wurden, um zu zeigen, daß das erhitzte Serum allein, oder die präzipitable Substanz allein bei so protrahierter Aufbewahrung in einem gut gekühlten Raum keine Spur von Niederschlag absetzen.

Wir müssen also zunächst konstatieren: das Präzipitin wird durch Erhitzen auf 68—70° garnicht „inaktiviert", sondern nur geschwächt, einerseits zeitlich, durch Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit, andererseits auch etwas in quantitativer Beziehung. Es handelt sich also beim Zusatz von etwas unerhitztem Serum, wie in Tabelle I, nicht um eine „Reaktivierung", sondern nur um eine Beschleunigung der an sich noch vorhandenen Präzipitinwirkung. Im weiteren haben mich Versuche, deren Protokolle im einzelnen einerseits wegen ihrer Ausdehnung, andererseits wegen der geringen Resultate, welche sie gezeitigt haben, hier nicht wiedergegeben werden sollen, davon überzeugt, daß man keineswegs an eine katalytisch beschleunigende Wirkung des unerhitzten Präzipitins auf das erhitzte Präzipitin denken darf, sondern es ist einfach so: Wenn das Gemisch n Präzipitin + m erhitztes Präzipitin enthält, so ist die Reaktionsgeschwindigkeit größer, als wenn es (n + m) erhitztes Präzipitin, ohne unerhitztes Präzipitin enthält, aber kleiner, als wenn es (n + m) unerhitztes Präzipitin, ohne erhitztes Präzipitin enthält.

Ähnliche, wenn auch weniger intensive Veränderungen erleidet das Präzipitin oft auch bei sehr langer Aufbewahrung mit Chloroform.

Dieses aufbewahrte Serum wirkt langsamer als frisches und auch quantitativ geringer. Außerdem geht die Empfindlichkeit zurück, d. h. die minimale Dosis präzipitabler Substanz, welche gerade noch einen Niederschlag mit einer gegebenen Menge Präzipitin erzeugt, ist bei frischem Präzipitin etwas kleiner als bei altem.

Aus alle dem ergibt sich, daß weder das Erhitzen auf 68—70° noch das Aufbewahren geeignete Methoden sind, um das Präzipitin völlig zu inaktivieren. Es bildet sich immer nur ein Zwischenstadium zwischen aktivem und inaktivem Präzipitin, und die Resultate werden verschleiert und der Deutung zunächst schwer zugänglich. Um das Präzipitin völlig zu inaktivieren, bedarf es höherer Temperaturen, wie die weiter unten zitierten Autoren sie in der Tat schon angewandt haben, und zwar vorzüglich zur Inaktivierung der Bakterien-Agglutinine. Die von Eisenberg und Volk, E. P. Pick, Wassermann, sowie von Kraus und von Pirquet zunächst an den Bakterienagglutininen gemachten Beobachtungen lassen sich dahin zusammenfassen, daß das Agglutinin durch Erhitzen seine Eigenschaften derart verändert, daß es die Agglutinationskraft verliert und dafür die Eigenschaft gewinnt, in Berührung mit den Bakterien gebracht, diese vor der Wirkung nachträglich zugesetzten Agglutinins zu schützen. Dasselbe Verhalten wurde für die Eiweißpräzipitine von P. Th. Müller am Lactoserum, und von Eisenberg am Serumpräzipitin festgestellt. Ich muß nunmehr die Richtigkeit dieser Angaben für die Serumpräzipitine bestätigen und meine anfänglich abweichenden Resultate auf jene ungenügende Inaktivierung zurückführen.

Der größte Teil meiner Versuche wurde mit dem Serum von Kaninchen angestellt, welche etwa 5 Wochen lang mit Pferdeserumalbumin und Ziegenserumalbumin vorbehandelt waren. Dieses wurde dadurch gewonnen, daß Pferdeserum (bezw. Ziegenserum) mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, filtriert, und das Filtrat 8 Tage lang gegen fließendes Wasser dialysiert wurde. Das Serum der so vorbehandelten Tiere enthielt ein sehr kräftig wirkendes Präzipitin, welches auf Pferdeserum, Pferdeserumalbumin und -globulin wirkte. Auf Ziegenserumalbumin wirkte eins der Pferdepräzipitine unter den für den Ausfall der Reaktion günstigsten quantitativen Verhältnissen gerade eben spurenweis. Das Ziegenpräzipitin war gegen Pferdeeiweiß in jeder Form ganz wirkungslos.

Dieses präzipitinhaltige Serum wurde, 5fach mit Leitungswasser verdünnt, 35—45 Minuten im Wasserbad auf 72° erhitzt.

Es nimmt dabei eine ganz leichte Opaleszenz an, zeigt aber noch keine Koagulationserscheinungen.

Tabelle III.

	a	b	c	d	e	f	g
						Kontrolle über die Unwirksamkeit von Pr ϑ	
Pferdealbumin 10fach verdünnt	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Pr ϑ	0	0,2	0,5	1,0	1,8	0,2	1,0
Isotonisches Wasser . .	1,8	1,6	1,3	0,8	0	1,7	0,9
10 Minuten später: Präzipitin	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0
Resultat	++	Spur trüb	0	0 leicht opal.	0 leicht opal.	0	0, leicht opal.

Pr ϑ = 5fach verdünntes, 3/4 Std. auf 72° erhitztes Präzipitin.

Tabelle III zeigt, daß in der Tat dieses erhitzte Präzipitin, zu dem präzipitablen Eiweißkörper hinzugefügt, diesen vor der fällenden Wirkung des nachträglich zugesetzten Präzipitins schützt. Zur näheren Erläuterung dieser Tabelle sei hinzugefügt, daß die in Kolumne d, e und g notierte „leichte Opaleszenz" nicht zu einer Niederschlagsbildung führte und nicht durch Zusammenwirken der vermischten Substanzen entstanden ist, sondern nur derjenigen geringen Opaleszenz entspricht, welche das, wie gesagt, an sich leicht opaleszierende erhitzte Präzipitin in gleicher Verdünnung besitzt. Das wurde durch in der Tabelle nicht mit aufgeführte Kontrollröhrchen stets genau verglichen. Wie man sieht, haben in Tabelle III, c 0,5 ccm des erhitzten, 5fach verdünnten Präzipitins genügt, um 0,1 ccm 10fach verdünntes Pferdeserumalbumin vor der fällenden Wirkung von 0,1 ccm Präzipitin zu schützen, während dieser Schutz in der Kolumne b mit 0,2 ccm nicht völlig ausgereicht hatte.

Wenn ich nun früher gezögert habe, diese hemmende Wirkung des erhitzten Präzipitins als etwas Besonderes anzuerkennen, so geschah es deshalb, weil ich beobachtet hatte, daß überhaupt die Gegenwart eines beliebigen, wenn auch der Reaktion ganz fremden

Eiweißkörpers hemmend auf die Entstehung des Niederschlags wirkt. Diese Beobachtung kann ich auch jetzt durchaus bestätigen, aber die Unterschiede zwischen der Hemmung durch einen beliebigen Eiweißkörper und durch erhitztes Präzipitin sind doch ganz deutlich. Betrachten wir die Eigenschaften dieser beiden verschiedenartigen Hemmungsmittel gesondert.

1. Die hemmende Wirkung eines beliebigen Eiweißkörpers.

Tabelle IV.

0,85 % ClNa-Wasser	1,8	1,3	0,8
Normales Pferdeserum	0	0,5	1,0
Ziegenserumalbumin	0,2	0,2	0,2
Präzipitin gegen Ziegenserumalbumin	0,2	0,2	0,2
Resultat a) sofort	trüb	klar	klar
Resultat b) nach 1 Std.	grobe Flocken	feine Flocken	klar
Resultat c) nach 1½ Stdn.	fast völlig abgesetzt	gröbere Flocken	feine Flocken
Resultat d) nach 5 Stdn.	völlig abgesetzt	fast völlig abgesetzt	gröbere Flocken
Resultat e) nach 24 Stdn.	nicht mehr verändert gegen d)	völlig abgesetzt	völlig abgesetzt
Menge des Niederschlags nach 24 Stdn.	alle drei gleich		

In dieser Tabelle ist gezeigt, in welcher Weise Pferdeserum auf die Reaktion von Ziegenserumalbumin mit seinem entsprechenden, am Kaninchen gewonnenen Präzipitin wirkt*). Wenn man den Verlauf der Reaktion nach einer Stunde beobachtet, so müßte man sagen, daß 1,0 normales Pferdeserum völlig hemmend auf

*) Dieses Präzipitin hatte auf Pferdeserum keine Spur präzipitierender Wirkung.

das Ausfallen eines Niederschlages gewirkt hat. Wartet man aber länger ab, so sieht man, daß es sich doch nur um eine Verlangsamung der Reaktion handelt. Außerdem sieht man, wie außerordentlich große Mengen Pferdeserum zu dieser Verlangsamung notwendig waren. Das Endresultat ist aber selbst durch 1 ccm Pferdeserum nicht verändert. Außerdem ist diese Hemmungserscheinung absolut unspezifisch. Genau so wie hier das Pferdeserum, wirkte in anderen Versuchen Kaninchenserum, Menschenserum. Und genau so, wie hier die Reaktion von Ziegenserum mit seinem Präzipitin verlangsamt wurde, wurde in anderen Versuchen auch Pferdeserumpräzipitin in seiner Reaktion gegen Pferdeserum durch Ziegenserum oder Kaninchenserum gehemmt. Immer waren dazu verhältnismäßig große Dosen notwendig, und immer konnte diese Hemmung dadurch außer den Kreis der Betrachtung gezogen werden, daß man als definitives Resultat nicht das einstündige, sondern das 24stündige (im kalten Raum) ansah. Auch normales Kaninchenserum, auf 72° eine halbe Stunde erhitzt, wirkte nicht anders, wenn auch vielleicht eine Spur stärker, aber jedenfalls ganz unspezifisch und unbedeutend. Nur wenn der zu erwartende Niederschlag an Menge äußerst gering ist, kann gelegentlich das Ausfallen des Niederschlages durch diese Art der Hemmung ganz unterdrückt werden. Jedenfalls ist aber auch diese Wirkung unspezifisch, d. h. nicht auf ein bestimmtes Präzipitin gerichtet.

2. Die hemmende Wirkung des erhitzten Präzipitins.

Im Gegensatz hierzu ist die hemmende Wirkung des erhitzten Präzipitins einerseits bedeutend stärker, andererseits in dieser Intensität streng spezifisch nur auf die Reaktion desjenigen Präzipitins gerichtet, durch dessen Erhitzen es entstanden ist. Ich stelle der Tabelle II zwei andere Tabellen gegenüber, welche diese Spezifizität beweisen.

In der Tabelle V ist gezeigt, daß erhitztes Pferdeserumpräzipitin (dasselbe, welches auf unerhitztes Pferdeserumpräzipitin energisch hemmend wirkte) nicht hemmend wirkt auf Ziegenpräzipitin + Ziegenalbumin und in Tabelle VI auf Menschenserum- (bezw. Ascites-) Präzipitin + Ascites. Dabei sind die Mengen des Ziegen- und Menschenpräzipitins absichtlich sehr klein gewählt, so klein, daß eine geringe Verminderung nach Kontrollpräparaten überhaupt keine deutliche Fällung mehr gab. Trotzdem hat das erhitzte Pferdeserumpräzipitin in verhältnismäßig enormen Dosen nicht die Ausfällung dieses geringen Niederschlages verhindert. Es tritt zwar

in geringem Grade jene oben beschriebene, unbedeutende, verlangsamende Wirkung hervor, wenn man die Resultate schon nach 1 Stunde vergleichen wollte; dagegen ist in dem 24stündigen Resultat von einer Hemmung gar nichts mehr zu merken. Genau dasselbe Resultat ergab sich auch, wenn ich erhitztes Pferdepräzipitin auf Eierklarpräzipitin + Eierklar in derselben Anordnung und Reihenfolge, wie in Tabelle V und VI, wirken ließ.

Tabelle V.

Ziegenalbumin 20fach verdünnt	0,2 *)	0,2	0,2
Erhitztes **Pferde**präzipitin	0	0,5	1,0
Isoton. Wasser	1,0	0,5	0
Nach $^1/_4$ Stde.: **Ziegen**albuminpräzipitin	0,2	0,2	0,2
Resultat nach 20 Stdn.	+	+	+

Tabelle VI.

Menschl. Ascites, 4fach verdünnt	0,1	0,1	0,1	0,1
Erhitztes Pferdeserumalbuminpräzipitin	0	0,2	0,4	0
Physiol. ClNa-Lösung	0,6	0,4	0,2	0,9
Nach $^1/_4$ Stde.: Ascites-Präzipitin	0,3 **)	0,3	0,3	0
Resultat nach 16 Stdn.	+ völlig abgesetzt	+ völlig abgesetzt	+ völlig abgesetzt	0

*) Durch einen Vorversuch wurde ermittelt, daß dies die minimale Dosis Ziegenserumalbumin war, mit dem die angewandte Menge des Ziegenalbuminpräzipitins, welches 5 Wochen aufbewahrt war, gerade einen guten Niederschlag gab.

**) Durch einen Vorversuch wurde ermittelt, daß diese Dosis die minimale war, um mit der angewandten Ascitesflüssigkeit einen geringen, aber einwandsfreien Niederschlag zu erzeugen.

Beschäftigen wir uns jetzt nur noch mit der spezifischen Hemmungswirkung des erhitzten Präzipitins und betrachten die quantitativen Verhältnisse dieser Hemmung genauer.

Tabelle VII.

Pferdealbumin 10fach verdünnt . .	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Physiol. ClNa . . .	0,5	0,45	0,4	0,35	0,2	0
Erhitztes Pferdealbuminpräzipitin, 5fach verdünnt	0	0,05	0,1	0,15	0,3	0,5
Nach 10 Minuten: Pferdealbuminpräzipitin, 5fach verdünnt	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Resultat nach im kalten Raum 4 Stdn. . . .	++ abgesetzt	trüb, ohne Sediment	trüb, ohne Sediment	0*)	0*)	0*)
24 Stdn. . . .	ebenso	trüb, mit geringem Sediment	trüb, ohne Sediment	etwas trüb, ohne Sediment	etwas trüb, ohne Sediment	etwas trüb, ohne Sediment
48 Stdn. . . .	ebenso	trüb mit deutlichem Sediment	trüb, mit minimalem Sediment	etwas trüb, ohne Sediment	etwas trüb, ohne Sediment	etwas trüb, ohne Sediment

In Tabelle VII ist in allen Röhrchen das Gesamtvolumen, die Menge der präzipitablen Substanz und des Präzipitins konstant, und es variiert die Menge des erhitzten Präzipitins. Bei dieser Anordnung ist 0,1, sicher aber 0,15 ccm des 5fach verdünnten erhitzten Präzipitins schon ausreichend, um totale Hemmung der Sedimentbildung zu bewirken.

In Tabelle VIII ist dagegen, bei konstantem Gesamtvolumen, Präzipitin und erhitztem Präzipitin, die Menge der präzipitablen Substanz variiert. Es ist schon im ersten Röhrchen eine Opaleszenz entstanden, aber selbst im letzten, welches einen ganz kolossalen

*) Minimale Opaleszenz infolge Gehaltes an erhitztem Präzipitin, welches an sich, besonders wenn es verdünnt wird, ein wenig opalesziert.

Überschuß an präzipitabler Substanz enthält, ist es nicht zu einer vollkommenen Sedimentierung gekommen.

Tabelle VIII.

Pferdealbumin 10f. verdünnt . . .	0,1	0,3	0,5	Pferdealbumin unverdünnt	0,1	0,3
Physiol. ClNa. . .	0,4	0,2	0		0,4	0,2
Erhitztes Pferdealbuminpräzipitin 5fach verdünnt .	0,4	0,4	0,4		0,4	0,4
5fach verdünntes Pferdealbuminpräzipitin	0,3	0,3	0,3		0,3	0,3
Resultat nach im kalten Raum 4 Stdn. . .	leicht trüb, ohne Sediment	leicht trüb, ohne Sediment	leicht trüb, ohne Sediment		leicht trüb, ohne Sediment	sehr trüb
24 Stdn. . .						etwas Sediment
48 Stdn. . .						mehr Sediment
72 Stdn. . .						noch mehr Sediment

Die hemmende Wirkung des erhitzten Präzipitins wird also durch Steigerung der Dosis der präzipitablen Substanz äußerst schwer überwunden. Ein Gemisch von Präzipitin und präzipitabler Substanz, welches an sich eine sehr kräftige Reaktion gibt, wird durch sehr kleine Mengen von erhitztem Präzipitin, welche zur völligen Hemmung nicht ausreichen, derart beeinflußt, daß zwar eine Trübung entsteht, diese aber nicht, bezw. langsam und sehr schwer flockig wird oder gar ein Sediment liefert.

In Tabelle IX ist dagegen das Gesamtvolumen, die präzipitable Substanz (diese absichtlich in sehr geringer Menge) und das erhitzte Präzipitin konstant, und es variiert das unerhitzte Präzipitin.

Wie man sieht, überwindet eine Steigerung der Präzipitinmenge die hemmende Wirkung des erhitzten Präzipitins ebenfalls sehr schwer. Selbst bei der relativ kolossalen Präzipitinmenge der Kolumne d ist in 4 Stunden nur eine Trübung entstanden, erst nach 24 Stunden beginnt diese sich gerade zu einem Niederschlag zusammenzuballen. Die hemmende Wirkung des erhitzten Präzipitins wird also auch durch Steigerung der Menge des unerhitzten Präzipitins nur schwer überwunden, und eine scharfe Grenze in der Dosierung, unterhalb deren die Hemmung gerade eben noch vollkommen wäre, und oberhalb deren sie gerade überwunden würde, läßt sich durchaus nicht angeben, weil zwischen

Tabelle IX.

	a	b	c	d
Pferdealbumin 10fach verdünnt	0,1	0,1	0,1	0,1
Erhitztes Pferdealbuminpräzipitin, 5fach verdünnt	0,1	0,1	0,1	0,1
Physiol. ClNa	0,6	0,5	0,4	0,2
Nach 10 Minuten: Unverdünntes Pferdealbuminpräzipitin	0	0,1	0,2	0,4
Resultat nach 3 Minuten . . .	0	leicht trüb	trüb	stärker trüb
4 Stdn.	0	sehr trüb, kein Sediment	sehr trüb, kein Sediment	dicke Trübung, keine Spur Sediment
24 Stdn.	0	sehr trüb, keine Spur Sediment	dicke Trübung, keine Spur Sediment	dicke Trübung, außerdem Beginn der Sedimentierung
48 Stdn.	0	wie 24 Stdn	wie 24 Stdn.	Sedimentierung weiter fortgeschritten

völliger Hemmung und gänzlicher Einflußlosigkeit Übergänge vorhanden sind, wo zunächst eine geringe Opaleszenz entsteht, die keinen Niederschlag liefert, und wo ferner eine stärkere Trübung entsteht, die aber erst nach 2 Tagen Neigung zum Zusammenballen zeigt.

Das Verhalten des Röhrchens Tabelle IX, d entspricht genau dem Verhalten von Tabelle I, e. Hier finden wir daher die Deutung der Wirkung des nur auf 68° erhitzten Präzipitins. Dieses ist demnach nichts anderes als eine Mischung von noch unverändertem und schon verändertem Präzipitin.

Bisher wurde das Präzipitin immer einige Zeit nach der Einwirkung des erhitzten Präzipitins auf die präzipitable Substanz hinzugefügt. Jetzt entsteht die Frage, wie sich die Wirkung des erhitzten Präzipitins gestaltet, wenn es nachträglich auf den schon entstandenen Niederschlag einwirkt.

Tabelle X.

					Kontrolle
10fach verdünntes Pferdealbumin	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
5fach verdünntes Pferdealbuminpräzipitin	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Resultat nach 10 Min.:	Überall gut abgesetzter Niederschlag				
Der Niederschlag wird aufgeschüttelt					
a) in 5fach verd. erhitztem Präzipitin	0,3	0,6	1,2	2,0	—
b) in physiol. ClNa . . .	—	—	—	—	2,0
Sedimentierung des aufgeschüttelten Niederschlags: nach 4 Stdn. . . .	beginnt	0	0	0	beginnt
nach 24 Stdn. . . .	fast vollkommen	deutlich, aber unvollkommen	deutlich, aber unvollkommen	deutlich, aber unvollkommen	vollkommen
nach 48 Stdn. . . .	fast vollkommen	fast vollkommen	fast vollkommen	fast vollkommen	vollkommen

Diese Tabelle zeigt, daß ein schon entstandener Niederschlag, der in einer recht großen Menge von erhitztem Präzipitin aufgeschüttelt wird, sich fast völlig wieder absetzt, also nicht gelöst wird, als ob er in physiologischer Kochsalz-Lösung wieder aufgeschüttelt worden wäre, nur daß die Repräzipitation in Kochsalz-Lösung sehr viel rascher erfolgt als unter der Einwirkung des erhitzten Präzipitins. Auch wird in letzterem Fall die überstehende Flüssigkeit nicht ganz klar, sondern bleibt opaleszent.

Wir kommen nun zu einer anderen Art der Reaktionshemmung, nämlich durch einen Überschuß der präzipitablen Substanz. Während nämlich bei konstantem Gesamtvolumen und konstanter Menge präzipitabler Substanz die Menge des Niederschlags mit der Steigerung des Präzipitins bald ein Maximum erreicht, so daß fernere Vermehrung des Präzipitins weder vermehrend noch vermindernd auf die Menge des Niederschlags wirkt, so erreicht man bei anderer Versuchsanordnung, nämlich bei Konstanz des Gesamtvolumens und der Präzipitinmenge durch gesteigerten Zusatz von präzipitabler Substanz bald ein Optimum der Reaktion, welches durch weiteren Zusatz von präzipitabler Substanz wieder verschlechtert wird, ja schließlich bei weiterer Steigerung zum völligen Ausbleiben des Niederschlags führt. Also kurz: Überschuß von Präzipitin ist ohne Einfluß, Überschuß an präzipitabler Substanz macht die Reaktion rückgängig. Dieser Befund ist eine Bestätigung der Angabe von Halban und Landsteiner, Eisenberg, sowie Rostoski, und ich möchte zu dieser Frage nur einige weitere Ausführungen machen.

Diese Hemmung ist einer genauen Analyse viel besser zugänglich als die Hemmung durch erhitztes Präzipitin, weil sie sehr scharfe Grenzen der Dosierung hat.

Tabelle XI.

	a	b	c	d	e	f	g
Pferdeserum	0,7	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
Physiol. ClNa	0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,65
Pferdealbuminpräzipitin, 5fach verdünnt . . .	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Reaktion							
a) nach 5 Min.	0	0	0	0	0	trüb	trüb
b) nach 24 Stdn.	0	0	0	0	0?	+	++

Tabelle XI zeigt, wie die Niederschlagsbildung von Pferdealbuminpräzipitin mit Pferdealbumin durch einen Überschuß von Pferdeserum gehemmt wird.

Aber nicht nur eine Hemmung tritt ein, sondern der schon entstandene Niederschlag ist sogar mit großer Leichtigkeit in einem nachträglich zugefügten Überschuß des Pferdeserums wieder glatt löslich:

Tabelle XII.

Pferdealbuminpräzipitin . . .	0,3	0,3	0,3
Pferdeserumalbumin	0,05	0,05	0,05
	Nach 10 Minuten überall dicker Niederschlag. Dann aufgeschüttelt in:		
Physiol. ClNa	0,6	0,4	0,2
Pferdeserum	0,05	0,25	0,45
Resultat in 24 Stdn.	Sediment ++	Sediment +	Ganz klar

Dagegen vermindert ein fremdes Serum (Kaninchen-, Ziegenserum) die Stärke der Pferdepräzipitinreaktion nicht, gleichgültig, ob vor oder nach der Niederschlagsbildung hinzugefügt. Diese Hemmung ist also durchaus spezifisch.

Da nun fermentwidrige Wirkungen des Blutserums bekannt sind (labhemmende, trypsinhemmende) und diese hemmenden Substanzen erfahrungsgemäß sich mit den Globulinen aussalzen lassen, so lag auch hier die Annahme nahe, daß nicht der Überschuß der präzipitablen Substanz als solcher, sondern ein miteingeführtes Antipräzipitin die Hemmung bewirke. Es wurde deshalb Pferdeserum durch fraktionierte Ammonsulfatfällung nach Hofmeister in die geläufigen drei Fraktionen zerlegt: Euglobulin ($^1/_3$ Sättigung), Pseudoglobulin ($^1/_3$—$^1/_2$ Sättigung) und Albumin. Diese Fraktionen wurden, zunächst nur nach einfacher Fällung ohne Umfällung auf ihre hemmende Wirkung unter Anwendung eines Überschusses geprüft. Es zeigte sich kein Unterschied. Die hemmende Kraft nahm in dem Maße ab, als die einzelnen Fraktionen eben weniger Eiweiß enthielten als das Vollserum und war unter Anwendung annähernd gleicher Eiweißkonzentration bei allen Fraktionen gleich. Da sich hierbei keine Unterschiede ergaben,

wurde von einer Umfällung abgesehen, zumal die wichtigste in Frage stehende Fraktion, das Albumin, dem man unter Zugrundelegung aller Erfahrung am sichersten einen Antikörpergehalt absprechen kann, ja gleich bei der ersten Fällung globulinfrei entsteht. Das hemmende Moment ist also in der Tat nichts anderes als eben der Überschuß der präzipitablen Substanz. Rostoski ist zu derselben Anschauung gekommen, hält aber daneben einen besonderen Antipräzipitingehalt des Pseudoglobulins für wahrscheinlich.

Es erhebt sich nun die Frage, ob diejenige Menge präzipitabler Substanz, welche bei Vermischung mit einer gegebenen Menge Präzipitin gerade keinen Niederschlag mehr erzeugt, gleich derjenigen Menge ist, welche einen schon entstandenen Niederschlag eben wieder löst (natürlich abzüglich der zur Erzeugung dieses Niederschlags vorher zugefügten Menge). Mit anderen Worten: ob das Endresultat ein von der Reihenfolge der Vermischung der reagierenden Substanzen unabhängiger Gleichgewichtszustand ist, kurz ob es sich um einen vollkommen reversiblen Prozeß handelt. Bei den bezüglichen Versuchen zeigte es sich, daß man ein wenig größere Mengen präzipitabler Substanz braucht, um einen schon entstandenen Niederschlag wieder zu lösen, als um die Bildung des Niederschlags zu verhindern. Man vergleiche zu diesem Zweck Tabelle XI und XII. Diese beiden Tabellen sind vergleichbar, weil das Gesamtvolumen überall 1 ccm beträgt. In der Anordnung der Tabelle XI ist die völlig hemmende Menge 0,2 oder 0,3 ccm (Kolumne e und d); in Tabelle XII ist aber bei 0,3 (d. i. 0,05 + 0,25) noch ein deutliches, geringes Sediment. Jedoch möchte ich hierzu folgendes bemerken. Bei Gemischen, welche so große Mengen überschüssigen Eiweißes enthalten, wie die Versuchsanordnung es hier erfordert, ist die Beurteilung, wo gerade noch ein Niederschlag entsteht und wo nicht mehr, dadurch erschwert, daß jene oben erwähnte unspezifische Hemmungswirkung hinzukommt. Diese ist zwar nicht bedeutend, führt aber zu folgender Fehlerquelle. Bei der Versuchsanordnung, wo von vornherein überschüssige präzipitable Substanz zugegeben wird und der Niederschlag sich erst bilden soll, wird die unspezifische Hemmung sich zu der spezifischen addieren und, da der zu erwartende Niederschlag jedenfalls sehr gering ist, diesen vielleicht völlig in der Schwebe halten. Bei der anderen Versuchsanordnung aber, wo der Niederschlag schon zusammengeballt ist, fällt die unspezifische Hemmung ganz fort. Daher muß an sich schon bei der ersten Versuchsanordnung die minimale Hemmungsdosis kleiner ausfallen als bei der zweiten. Wenn man das

berücksichtigt, so muß man doch sagen, daß unter diesen Umständen eine auffällige Übereinstimmung der minimal hemmenden Dosen in beiden Versuchsanordnungen besteht. Es liegt daher der Schluß nahe, daß es in der Tat ein vollkommen reversibler Prozeß ist.

Im Gegensatz hierzu steht die oben beschriebene Wirkung des erhitzten Präzipitins. Dieses führte zu einem ganz verschiedenen Endresultat je nach der Reihenfolge, in der es zugegeben wurde. Damit ist allerdings nicht bewiesen, daß dieser Prozeß nicht reversibel sei; es ist sehr wohl denkbar, daß die Reaktionsgeschwindigkeit im Sinne der Wiederlösung eines schon entstandenen Niederschlags so klein ist, daß der definitive Gleichgewichtszustand innerhalb der 2—3 Tage, über welche sich die Beobachtungsdauer nicht gut ausdehnen läßt, noch nicht erreicht ist.

Die Deutung dieser Tatsachen ist nur zum Teil möglich, und dieser Teil nur mit Hilfe der Ehrlichschen Theorie über den Bau der Haptine überhaupt. Wenn ich es unternehme, für diese komplizierten Verhältnisse eine Deutung zu versuchen, so geschieht das weniger deshalb, weil ich die hier gegebene Deutung für unumstößlich richtig hielte, sondern vielmehr um der historischen Gerechtigkeit willen. Die Darlegungen, welche zu dieser Deutung führen, beruhen nämlich auf der Ehrlichschen Auffassung vom Bau der Toxine und der Toxoide. Und schwerlich wäre jemand ohne diese Ehrlichsche Hypothese auf den Gedanken gekommen, die Eigenschaften eines erhitzten Präzipitins zu untersuchen. Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie hat sich gerade hier als ein heuristisch außerordentlich fruchtbares Prinzip erwiesen.

Beginnen wir mit der Erklärung der Wirkung des erhitzten Präzipitins. Schon Eisenberg und Volk, Müller, A. Wassermann, Kraus und von Pirquet haben die Wirkung des erhitzten Agglutinins bezw. Präzipitins auf die Bildung von Agglutinoid bezw. Präzipitoid zurückgeführt. Nach Ehrlich muß man im Präzipitin mindestens zwei Atomkomplexe unterscheiden, die haptophore Gruppe, welche die Bindung der beiden reagierenden Substanzen bewirkt, und eine ergophore Gruppe, welche in diesem Fall die Ausfällung bewirkt. Durch das Erhitzen wird zunächst die ergophore Gruppe zerstört, und der Rest ist ein „Präzipitoid“, d. h. Präzipitin, welches noch das Eiweiß bindet, aber nicht mehr ausfällt. Da man mit Ehrlich wohl annehmen kann, daß die Avidität der haptophoren Gruppe durch Verschwinden der ergophoren etwas verändert wird, so werden wir uns auch hier die Frage vorlegen, ob die Avidität des Präzipitoids zur präzipitablen Substanz zum Eiweiß größer, gleich oder kleiner als die des Präzipitins ist. Die Tatsache, daß bei Ausführung der Reaktion in der Reihenfolge „Eiweiß, Präzipitoid, Präzipitin“ kein Niederschlag entsteht, spricht dafür, daß die Avidität des Präzipitoids größer geworden ist. Die Tatsache aber, daß bei der Reihenfolge: „Eiweiß, Präzipitin, Präzipitoid“ der einmal entstandene Niederschlag nicht merklich wieder gelöst wird, spricht nicht zu Gunsten der Annahme einer Vergrößerung der Avidität. Ja, die Inkongruenz dieser beiden Versuchsanordnungen beweist, daß man die Avidität nicht ohne weiteres nach den Erfahrungen der physikalischen Chemie an

krystalloiden Körpern beurteilen darf. Eigentlich müßte der Prozeß noch ganz anders verlaufen, wenn es nach den Gesetzen der physikalischen Chemie für krystalloide Körper ginge. Unabhängig von der Avidität müßte stets der unlösliche Körper in maximaler Menge, bis zum Aufbrauch der einen Komponente entstehen, und selbst bei noch so gesteigerter Avidität dürfte ein Präzipitoid die Wirkung des Präzipitins nicht hemmen. Daß das aber doch der Fall ist, rührt jedenfalls davon her, daß für kolloide Körper ganz andere Gesetze gelten und daß die „Avidität" eines Haptins nicht ohne weiteres mit der „Stärke" einer Säure oder Base vergleichbar ist.

Solange es sich nur um die völlige Hemmung der Niederschlagsbildung handelt, so lange gibt die Annahme des Präzipitoids eine ausreichende Erklärung. Schwieriger wird es bei denjenigen Reaktionen, bei denen die Trübung zwar entsteht, die Bildung und Absetzung eines Niederschlages aber verlangsamt oder unterdrückt wird. Dies tritt immer dann ein, wenn, ganz allgemein gesagt, die Menge des Präzipitoids zur völligen Hemmung der Reaktion zu klein ist. Es sei mir gestattet, auch hierfür eine Erklärung zu versuchen, welche sich allerdings, wie ich gestehen muß, bisher nur auf eine Analogie stützt und noch nicht als strenger Beweis angesehen werden kann. Wie nämlich Ehrlich und Morgenroth mit Hilfe der Absorptionsmethode nachgewiesen haben, ist ein rotes Blutkörperchen imstande, sehr wechselnde Mengen von Ambozeptoren zu binden. Wenn a diejenige Ambozeptorenmenge ist, welche bei geeignetem Zusatz von Komplement ein Blutkörperchen gerade komplett löst, so ist dieses Blutkörperchen imstande, nicht nur a, sondern auch 2a, 3a u. s. w., bis zu einer gewissen Grenze vollkommen zu absorbieren. Daraus folgt, daß die bindungsfähigen Moleküle des Blutkörperchens eine große Anzahl von Rezeptoren besitzen, welche sie je nach der Menge des vorhandenen Ambozeptors nur teilweise zur Bindung benutzen, und daß eine nur partielle Bindung zum Zustandekommen einer kompletten Hämolyse genügt.

Für die Agglutinine der Bakterien wurde ein gleiches Verhalten von Eisenberg und Volk (5) nachgewiesen. Bei der großen Analogie, die sich bisher in allen Eigenschaften der Haptine gezeigt hat, dürfen wir auch annehmen, daß das Molekül der präzipitablen Substanz mehrere Rezeptoren für das Präzipitin besitzt und bei gleichzeitiger Gegenwart von Präzipitin und Präzipitoid die einen an Präzipitin, die anderen an Präzipitoid binden wird. Es ist sehr wohl denkbar, daß jener stark opaleszierende Zustand der Lösung, in der sich die Bildung eines Niederschlags erst spät oder gar nicht bemerkbar macht, einer gleichzeitigen Bindung verschiedener Rezeptoren teils an Präzipitin, teils an Präzipitoid entspricht.

Es ist wahrscheinlich, daß die andere Hemmungserscheinung, die durch einen Überschuß der präzipitablen Substanz, auf ähnliche Weise zu erklären ist. Wir brauchen hierzu nur eine Hilfsannahme zu machen, daß nämlich zur Ausfällung des Eiweißes die Bindung mehrerer Rezeptoren an das Präzipitin notwendig ist. Ist dann die Menge der präzipitablen Substanz relativ so groß, daß etwa auf je ein Eiweißmolekül nur je ein Präzipitinmolekül kommt, so wird die Ausfällung unterbleiben. Auch die Tatsache, daß ein einmal entstandener Niederschlag durch nachträglich zugefügten Überschuß an präzipitabler Substanz wieder in Lösung gebracht wird, ist damit gut zu vereinen. Ganz analog hat nämlich Morgenroth gefunden, daß, wenn rote Blut-

körperchen mit einem Multiplum der einfach lösenden Dosis von Ambozeptor beladen sind und man frische, unbeladene rote Blutkörperchen in die Mischung bringt, dann eine gleichmäßige Verteilung der gesamten Ambozeptormenge auf alle Blutkörperchen eintritt. Leider läßt sich die Absorptionsmethode bei den Präzipitinen nicht anwenden, weil diese eben nur mit korpuskulären Elementen, nicht aber mit Eiweißlösungen durchführbar ist, so daß, wie ich gestehen muß, ein exakter experimenteller Nachweis für die entwickelte Anschauung bisher nicht möglich ist.

Eine wichtige Regel für die Ausführung von Präzipitinreaktionen folgt aus der Tatsache, daß der Niederschlag im Überschuß der präzipitablen Substanz löslich ist: bei der Prüfung eines Serums auf etwaigen Präzipitingehalt muß man stets relativ geringere Mengen der präzipitablen Substanz mit relativ größeren Mengen des fraglichen präzipitinhaltigen Serums mischen, weil sonst selbst bei vorhandenem Präzipitin die Niederschlagsbildung doch ausbleiben kann.

Zusammenfassung.

Zum Schluß fasse ich die besprochenen Tatsachen kurz dahin zusammen:

Die Präzipitinreaktion kann durch verschiedene Einflüsse gehemmt bezw. rückgängig gemacht werden; diese Einflüsse sind teils allgemeiner, teils spezifischer Natur.

Jede Eiweißlösung in etwas erheblicherer Konzentration hemmt in geringer Weise jede Präzipitinreaktion derart, daß das Ausfallen des Niederschlags etwas verlangsamt wird. Ist der zu erwartende Niederschlag sehr gering, so kann dieser unter Umständen sogar ganz in der Schwebe gehalten werden.

Dies ist also eine unspezifische, allgemeine Hemmung.

Ein auf 72° erhitztes Präzipitin hat keine präzipitierende Eigenschaft mehr, hemmt aber, mit der präzipitablen Substanz in Berührung gebracht, deren Fällung durch nachträglich zugefügtes Präzipitin.

Diese Hemmung ist streng spezifisch, indem das erhitzte Präzipitin diese Wirkung nur auf die Reaktion desjenigen Präzipitins entfaltet, aus dem es durch Erhitzen hervorgegangen ist.

Diese Art der Hemmung ist quantitativ sehr viel erheblicher als jene oben beschriebene unspezifische Hemmung.

In einer zur völligen Hemmung ungenügenden Menge angewandt, verhindert das erhitzte Präzipitin zwar nicht völlig die Entstehung einer Trübung, bewirkt aber, daß diese sich langsamer als sonst zu einem wirklichen Niederschlag zusammenballt.

Auf den schon entstandenen Niederschlag hat das erhitzte Präzipitin nur eine zweifelhafte lösende Wirkung, bewirkt aber, daß der Niederschlag sich nach dem Aufschütteln viel langsamer wieder zusammenballt als sonst.

Ein Überschuß an präzipitabler Substanz verhindert die Ausfällung der präzipitablen Substanz durch das Präzipitin.

Ein schon entstandener Niederschlag wird durch einen nachträglich zugefügten Überschuß an präzipitabler Substanz schnell und glatt wieder gelöst.

Das endgiltige Resultat der Wirkung des erhitzten Präzipitins ist von der Reihenfolge, in welcher es dem Reaktionsgemisch zugegeben wird, stark abhängig.

Das endgiltige Resultat der Wirkung des Überschusses von präzipitabler Substanz ist von der Reihenfolge, in welcher dieser dem Reaktionsgemisch zugegeben wird, fast unabhängig.

Die eigenartige Wirkung eines ungenügend erhitzten Präzipitins ist nichts weiter als eine Kombination der Wirkung von genügend erhitztem und von unerhitztem Präzipitin.

Literatur betreffend Hemmung der Präzipitinreaktion.

1. Bail, Untersuchungen über die Agglutination von Typhusbakterien. Prager med. W. 1902, S. 85, 137, 385, 399.

2. Ehrlich und Morgenroth, Über Hämolysine, 5. Mitteilung. Berl. klin. Wochenschr. 1901, S. 251.

3. Eisenberg, Beiträge zur Kenntnis der spezifischen Präzipitationsvorgänge. Bull. de l'ac. d. sc. de Cracovie. Mai 1902.

4. Eisenberg, Untersuchungen über spezifische Präzipitationsvorgänge. Centralbl. f. Bakt. 1902, **31**, 773.

5. Eisenberg und Volk, Untersuchungen über die Agglutinine, Wiener klin. Wochenschr. 1901, S. 1221.

6. Halban und Landsteiner, Über Unterschiede des fötalen und mütterlichen Blutserums und über eine agglutinations- und fällungshemmende Wirkung des Normalserums. Münch. med. Wochenschr. 1902, Nr. 12, S. 473.

7. Halban und Landsteiner, Zur Frage der Präzipitationsvorgänge. Centralbl. f. Bakt. 1902, **32**, 457.

8. Kraus und von Pirquet, Weitere Untersuchungen über spezifische Niederschläge. Centralbl. f. Bakt. 1902, **32**, 60.

9. Landsteiner und Calvo, Zur Kenntnis der Reaktionen des normalen Pferdeserums. Centralbl. f. Bakt. 1902, **31**, 781.

10. Michaelis, L., Über Inaktivierungsversuche mit Präzipitinen. Centralbl. f. Bakt. 1902.

11. Müller, P. Th., Vergleichende Studien über die Gerinnung des Caseïns durch Lab- und Lactoserum. Münch. med. Wochenschr. 1902, S. 272, und Archiv f. Hygiene, 1902, **44**, 126.

12. Müller, P. Th., Weitere Studien über die Fällung des Caseïns durch Lab- und Lactoserum. Centralbl. f. Bakt. 1902, **32**, 521.

13. Pick, F. P., Zur Kenntnis der Immunkörper. Diese Beitr. I, 7/9 und 10/12. 1901/1902.

14. Wassermann, A. (Diskussion). Dtsch. med. Wochenschr. Vereinsbeilage, Nr. 3, S. 1902.

15. Wassermann, A., Über Agglutinine und Präzipitine. Zeitschr. f. Hyg. 1903, S. 267.

VI.

Über die antitryptische Wirkung des Blutes*).

Von Dr. **Karl Glaessner.**

Aus der medizin. Klinik zu Würzburg (Geh. Rat v. Leube) und der inneren Abteilung des Augusta-Hospitals zu Berlin (Geh. Rat Ewald).

Die Bakteriologie hat uns gelehrt, gegen Toxine Antitoxine zu erzeugen, sie hat uns gezeigt, daß der normale Organismus für viele Gifte, die von den Bakterien produziert werden, über Gegengifte verfügt, die imstande sind, eine Menge des eingeführten Toxins zu binden. Es lag sicher nahe, zu untersuchen, ob nicht auch die Fermente, die den Bakteriengiften so nahe stehen, im Körper Antifermente erzeugen, beziehungsweise solche im Organismus schon vorgebildet vorfinden. Tatsächlich hat sich ergeben, daß beides der Fall ist. Hammarsten konnte zeigen, daß normales menschliches Blut die Wirkung des Labferments beeinträchtigt. Röden wies nach, daß als Ursache dafür ein im Blute vorhandenes Antilab anzusehen sei, das auch Ferment-Eigenschaften besitzt. Morgenroth (Centralblatt f. Bakt. **26**, 11) gelang es später, durch Injektionen von Labferment eine gesteigerte antilabende Wirkung des Blutes zu erzielen. Fuld und Spiro (Z. f. physiol. Chemie **31**, 1900) vermochten eine doppelte Fermentfunktion im Blute nachzuweisen, eine Komponente, die selbst labend wirkt und ein Ferment zu sein scheint, eine zweite, die das Antilab repräsentiert und auf ein spezifisches Verhalten des Globulins zu Calciumsalzen der Milch zurückgeführt wird.

Auch für das Pepsin hat man Antikörper im Organismus entweder gefunden oder erzeugt. Sachs (Fortschr. d. Medizin 1902) hat Gänse künstlich gegen Pepsin immunisiert, Weinland (Z. f. Biologie 1902, 26, 1) hat in der Magenschleimhaut eine fermentartige durch Alkohol fällbare Substanz gefunden, die die Schleimhaut durch ihre Pepsin zerstörende Wirkung vor der Selbstverdauung zu schützen vermag.

Recht zahlreich sind die Versuche, die Antikörper des Trypsins zu finden, gewesen. Zuerst haben Fermi und Pernossi (Zeitschr.

*) Die Resultate vorliegender Untersuchungen sind in der Sitzung vom 7. Febr. 1903 in der physiolog. Gesellschaft zu Berlin kurz besprochen worden.

f. Hyg. 18) darauf aufmerksam gemacht, daß Organpreßsäfte die Wirkung des Trypsins herabsetzen. Hahn (Berl. klin. W. 1897) zeigte, daß diese Wirkung speziell dem Blute und zwar dem Blutserum zukomme. Achalme (Annal. de l'Inst. Pasteur 1901, 737) konnte Meerschweinchen gegen Trypsin durch wiederholte Injektionen immun machen, Weinland stellte aus der Darmschleimhaut ein Antitrypsin dar, das ähnlich wie sein Antipepsin wirksam war, Landsteiner (Centralblatt f. Bakt. 1900) schrieb die antitryptische Fähigkeit des Blutes der mit dem Albumin fallenden Fraktion des Bluteiweißes zu.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß im normalen Blut Schutzstoffe gegen die körpereigenen Fermente vorhanden sein müssen — denn bekanntlich erscheinen ja die Fermente nur in Spuren im Urin, müssen mithin auf dem Wege zwischen Verdauungskanal und Niere zum großen Teil zerstört werden — ging ich daran, das normale Blut bezüglich seiner Fähigkeit, das Trypsin zu schädigen, genauer zu untersuchen.

Das Trypsin bietet bezüglich seiner Untersuchung keine solchen Schwierigkeiten wie das Pepsin, dessen Wirkung ja schon durch das Alkali des Blutes geschädigt wird, ein Umstand, der beim Trypsin in Wegfall kommt. Zuerst muß geprüft werden, welcher Anteil des Blutes das Vermögen besitzt, das Trypsin in seiner Verdauungskraft zu hemmen, ob es den körperlichen Elementen des Blutes zukomme, oder ob das Blutplasma daran beteiligt sei. Es wurden zu diesem Zwecke Blutserum und Blutkuchen gesondert untersucht, und es konnte festgestellt werden, daß die Wirkung des Serums eine weitaus größere und die Wirkung der Blutkörperchen wohl nur durch anhaftende Spuren des Serums bedingt war. Es wurde nun das Serum nach diesen Vorversuchen einer genaueren Prüfung bezüglich seines antitryptischen Verhaltens unterzogen.

I. Ist die antitryptische Wirkung des Blutes spezifisch?

Geprüft wurden die Blutsera vom Menschen, Rind, Pferd, Schaf, Ziege, Hund, Gans, Kaninchen, Schwein, Maus.

Das Serum wurde teils durch Stehenlassen des frisch und unverändert entnommenen Blutes gewonnen, teils wurde es durch Zentrifugieren des defibrinierten Blutes erhalten. Menschliches Blut wurde in größeren Mengen aus der geburtshilflichen Klinik zu Würzburg beschafft (Placentarblut).

Trypsin wurde aus Trockenpankreas nach dem Verfahren von Kühne dargestellt.

Es wurden die Drüsen der genannten Tiergattungen zerkleinert,

2 Tage in der Wärme (bei 40°) stehen gelassen und dann getrocknet und fein pulverisiert. Ein alkalischer Auszug lieferte dann eine recht wirksame Trypsinlösung, die allerdings den verschiedenen Tierarten entsprechend ungleich wirksam war. Doch gelang es bei völliger Gleichheit der Versuchsbedingungen (gleiche Mengen Trockenpankreas, entsprechende Mengen Wasser und Soda) annähernd vergleichbare Resultate zu erzielen.

Zur Trypsinlösung wurden verschiedene Mengen Blutserums hinzugefügt und die Größe der Verdauung für gewöhnlich mittelst der Mettschen Röhrchen geprüft. Kontrollversuche wurden mit Gelatineröhrchen ausgeführt, derart, daß die Gelatine einfach mit der Trypsin-Blutserum-Mischung überschichtet und die Höhe der bei Zimmertemperatur in 24 Stunden verflüssigten Schichte gemessen wurde.

Mit der beschriebenen Methodik wurde das Einwirken der Blutsera verschiedener Tiere auf das Trypsin dieser Tiergattungen studiert und zwar derart, daß das Trypsin einer Tierart, z. B. des Hundes, auf die ganze Reihe der Sera der untersuchten Tiere, zur Einwirkung gelangte, andererseits das Serum einer Tiergattung bezüglich seiner hemmenden Wirkung auf Trypsine verschiedener Tierspezies geprüft wurde. Ich lasse eine Tabelle einiger Versuche in dieser Richtung folgen.

I. Trypsin-Lösung vom Rind (1-proz. = 1 Tl. Pankreas auf 100 Tle. Extrakt); Blutsera vom Menschen, Pferd, Rind, Schwein, Hund, Kaninchen, Verdauungsprobe nach Mett.

Blutserum je 2 ccm vom	1-proz. Trypsinlösg. vom **Rind**	Länge der verdauten Eiweißsäule in 24 h
Menschen	10 ccm	6 mm
Pferd	10 ccm	5 mm
Rind	**10 ccm**	**2 mm**
Schwein	10 ccm	4 mm
Hund	10 ccm	4 mm
Kaninchen	10 ccm	4 mm

II. Blutserum vom Schwein, Trypsinlösungen (1-proz.) vom Menschen, Pferd, Rind, Schwein, Hund, Kaninchen, Verdauung nach Mett.

1-proz. Trypsinlösung, je 10 ccm, vom	Blutserum vom **Schwein**	Länge der in 24 h verdauten Eiweißsäule
Menschen	2 ccm	5 mm
Pferd	2 ccm	5 mm
Rind	2 ccm	6 mm
Schwein	**2 ccm**	**3 mm**
Hund	2 ccm	5 mm
Kaninchen	2 ccm	5 mm

Es ist ohne weiteres klar, daß diese Versuche noch mannigfach variiert, daß die Mengen des zugesetzten Blutserums, die Mengen bezw. Konzentrationen der Trypsinlösungen abgestuft, ferner auch die Trypsine aller angeführten Tierspezies im Verhalten gegen die Blutsera derselben untersucht werden konnten. Aus den angeführten 2 Versuchen leuchtet aber schon ein, daß das Blutserum eine spezifisch antitryptische Wirkung entfaltet, daß es am stärksten hemmend wirkt auf das Trypsin derselben Tierart.

II. Welche Fraktion des Blutserums enthält das Antitrypsin?

Wir wissen, daß die Fermente mit den verschiedenen Eiweißkörpern niedergeschlagen werden, daß sie gewissermaßen aussalzbar sind. Mit Rücksicht auf die interessanten Befunde von Fuld und Spiro beim Labferment, machte ich mir es zur Aufgabe, mit Hilfe der von den genannten Autoren angegebenen Methodik zu prüfen, ob man vielleicht das Antitrypsin im Blutserum an eine bestimmte Fraktion des Eiweißes gebunden findet, oder ob diese Wirkung allen im Bluteiweiß vorhandenen Eiweißkörpern zukommt. Fuld und Spiro machen für das Antilab eine Fraktion des Globulins, das sogenannte Euglobulin im Sinne Hofmeisters, verantwortlich. Landsteiner führt die antitryptische Wirkung des Blutserums auf die Albuminfraktion zurück.

Ich verfuhr folgendermaßen: Es wurden größere Mengen Pferdeblutserum mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt und sowohl das gefällte Globulin, als das im Filtrat befindliche Albumin untersucht. Das Filtrat wurde mit Ammonsulfat bis zur Sättigung versetzt, der Niederschlag gelöst, 3 Tage dialysiert, wiederum gefällt und dialysiert und das dialysierte, salzfreie Albumin geprüft. Es ergab sich eine kaum nennenswerte Beeinträchtigung der Trypsinverdauung, die Albuminfraktion scheint somit das Antitrypsin nicht zu enthalten.

Es wurde nun zur Prüfung der Globulinfraktion geschritten. Der Niederschlag wurde gelöst, gefällt, dialysiert und das dialysierte Globulin untersucht. Es zeigte sich deutlich antitryptische Wirkung. Das Globulin des Blutserums läßt sich nach den in Hofmeisters Laboratorium gemachten Beobachtungen in mindestens 3 Fraktionen zerlegen: in das bei 25 Proz. Sättigung mit Ammonsulfat ausfällbare Fibrinoglobulin, in das Euglobulin, das bei einer Sättigung von 33 Proz. ausfällt und bei der Dialyse in Lösung bleibt, und endlich in das bei 38 Proz. Sättigung ausfällbare, bei der Dialyse unlösliche Pseudoglobulin. Diese 3 Fraktionen

wurden gesondert untersucht, es zeigte sich, daß das Antitrypsin mit der Euglobulin-Fraktion ausgesalzen wird*).

Ein Versuch soll diese Verhältnisse illustrieren.

Es wurden 500 ccm Pferdeblutserum mit dem gleichen Volumen Ammonsulfat-Lösung versetzt, nachdem vorher die antitryptische Wirkung des Serums auf eine 1-proz. Trypsinlösung, von Pferdepankreas herrührend, bestimmt worden war.

I.

1-proz. Trypsinlösung vom Pferde	Blutserum vom Pferde	H_2O	Länge der in 24 h verdauten Eiweißsäule
10 ccm	2 ccm	Ø	1 mm
10 ccm	Ø „	2 ccm	5 mm

II. Der Globulinniederschlag wird gelöst, dialysiert, noch zweimal gefällt und das ursprüngliche Flüssigkeitsvolumen hergestellt.

1-proz. Trypsinlösung	Euglobulin	Länge der in 24 h verdauten Eiweißsäule
10 ccm	2 ccm	1 mm

III. Das bei der Dialyse ausfallende Pseudoglobulin wird gelöst und auf das ursprüngliche Volumen gebracht.

1-proz. Trypsinlösung	Pseudoglobulin	Verdauung
10 ccm	2 ccm	4 mm

IV. Das im Filtrat vorhandene Albumin wird in ähnlicher Weise ausgesalzen, dialysiert, dieser Vorgang noch zweimal wiederholt, dann das ursprüngliche Volumen hergestellt.

1-proz. Trypsinlösung	Albumin	Verdauung
10 ccm	2 ccm	5 mm

Es ist somit erwiesen, daß das Englobulin der Träger der antitryptischen Wirkung des Blutes ist, eine An-

*) In jüngster Zeit haben Oppenheimer für das Albumin, Freund und Joachim (Zeitschrift f. physiol. Chemie 36, 407) sowie Spiro und Porges (diese Beiträge 3, 277) für das Globulin noch mehrere Fraktionen unterschieden. Diese Arbeiten waren zur Zeit meiner Versuche, die in das Wintersemester 1901—1902 fielen, noch nicht veröffentlicht und konnten daher nicht berücksichtigt werden.

sicht, die mit der von Landsteiner vorgebrachten im Widerspruch steht.

III. Wie verhält sich das Antitrypsin während der Verdauung.

Auf Grund der Annahme, daß dem Blut fermentzerstörende Substanzen zur Verfügung stehen, die bei der unzweifelhaft vor sich gehenden Resorption der Fermente eine Rolle spielen, war es naheliegend, nachzusehen, ob die antitryptische Wirkung des Blutes vielleicht zu der stärkeren Produktion und Resorption des Trypsins zur Zeit der Verdauung in Beziehung steht, und zwar ob die antitryptische Kraft des Blutes im verdauenden Zustande des Organismus eventuell größer ist als zu einer Zeit, wo kein Trypsin abgesondert wird, also im nüchternen Zustande. Es wurden zum Zwecke dieser Untersuchung das Blutserum von Mensch und Hund im nüchternen Zustand und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einnahme einer Mahlzeit geprüft.

Ich teile die einschlägigen Versuche mit:

I. Hund von mittlerer Größe. Dem Tier wird in nüchternem Zustand Blut (10 ccm) entnommen und dessen Wirkung auf Hundetrypsin festgestellt.

1-proz. Trypsinlösung	Blutserum	Verdaute Eiweißsäule in 24 h
10 ccm	2 ccm	3 mm

Das Tier erhält 1/2 Kilo Fleisch, es wird alle Stunden Blut aus der Schenkelvene entnommen.

1-proz. Trypsinlösung	Blutserum	Entnommen nach der Mahlzeit	Länge der verdauten Eiweißsäule in 24 h
10 ccm	2 ccm	nach 1 Stunde	3 mm
"	"	" 2 Stunden	3 mm
"	"	" 3 "	3 mm
"	"	" 4 "	2 mm
"	"	" 5 "	1 mm
"	"	" 6 "	1 mm

II. Derselbe Versuch wird am Menschen ausgeführt:

Nüchtern.

1-proz. Trypsinlösung vom Menschen	Blutserum	Länge der verdauten Eiweißsäule
10 ccm	2 ccm	2 mm

Nach Einnahme einer gemischten Mahlzeit:

10 ccm	2 ccm	Stunde nach der Mahlzeit	Länge der verdauten Eiweißsäule
"	"	2. Stunde	2 mm
"	"	4. Stunde	Ø
"	"	6. Stunde	Ø

III. Versuch am Menschen. Der Versuch wurde dahin abgeändert, daß nicht Leichenpankreas, sondern menschlicher aktivierter Pankreassaft verwendet wurde, dessen Gewinnung ich einem glücklichen Zufall verdanke und worüber anderweitig berichtet worden ist*).

Aktiver Pankreassaft vom Menschen	Blutserum nüchtern	Länge der verdauten Eiweißsäule
10 ccm	2 ccm	3 mm

Nach der Mahlzeit

		Zeit nach der Mahlzeit	Länge u. s. w.
10 ccm	2 ccm	2 Stunden	3 mm
"	"	4 "	2 mm
"	"	6 "	Ø

Aus den angeführten Versuchen, denen sich noch eine Reihe anderer anreihte, ist ohne weiteres ersichtlich, daß die Antitrypsinwirkung während der Verdauung zunimmt, daß also ein Konnex zwischen Trypsinabsonderung und Antitrypsinbildung im Blut bestehen muß. Das Ferment wird eben zur Zeit der Verdauung nicht nur am stärksten sezerniert, sondern wohl auch am reichlichsten resorbiert, und es muß deshalb die deletäre Wirkung der Antikörper dieses Ferments im Blute an Intensität zunehmen. So werfen diese Tatsachen ein interessantes Streiflicht auf die intermediären Vorgänge bei der Verdauung und lassen eine ingeniöse Gesetzmäßigkeit in dem Ineinandergreifen der verschiedenen Fermente und Antifermente erkennen.

Fasse ich die Resultate der vorstehenden Untersuchungen in einige Schlußsätze zusammen, so würden diese lauten:

1. Die antitryptische Kraft des Blutes ist für Blutsera und Trypsine verschiedener Tierarten verschieden. Sie ist am stärksten gegenüber dem Trypsin derselben Spezies, somit spezifisch.

2. Die Wirkung des Antitrypsins ist an die Euglobulinfraktion des Blutserums gebunden.

*) Deutsche med. Wochenschrift 1903, Nr. 15, Verein f. inn. Medizin, Berlin.

3. Die Menge des Antitrypsins nimmt im Blute zur Zeit der Verdauung zu, was für die Annahme einer Zerstörung des resorbierten Ferments im Blut zu sprechen scheint.

In allerjüngster Zeit hat Delezenne (C. R. de la Soc. Biol. 1903, 30. Januar) eine interessante Aufklärung der Antitrypsin-Wirkung des Blutes zu bringen gesucht. Er nimmt auf Grund einiger dahin zu deutender Experimente an, daß die antitryptische Wirkung des Blutes sich nicht gegen das Trypsin als solches, sondern gegen das aktivierende Prinzip, die Enterokinase, richtet, daß wir mithin nicht eine antitryptische, sondern eine Antikinasenwirkung des Blutes anzunehmen haben. Ich bin damit beschäftigt, diese Anschauung nachzuprüfen, und behalte mir die Resultate der Untersuchung für eine spätere Mitteilung vor.

Zum Schlusse erfülle ich eine angenehme Pflicht, indem ich den Herren Geheimrat Prof. Dr. W. von Leube und Geheimrat Prof. Dr. C. A. Ewald für ihr gütiges Interesse, sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. Rostoski zu Würzburg für seine liebenswürdige Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank zum Ausdruck bringe.

Buchdruckerei A. W. Zickfeldt, Osterwieck/Harz.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

IV. Band. 3. und 4. Heft

(Ausgegeben Juni 1903)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1903

Inhalt des 3. und 4. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

VII.

Untersuchungen über die Abhängigkeit der autolytischen Prozesse von physiologischen und pathologischen Verhältnissen.

Von Dr. **Eugen Schlesinger**, Kinderarzt.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Es ist das Verdienst Salkowskis*), 1880 durch seine grundlegenden Untersuchungen über die Autodigestion der Organe auf die Bedeutung dieses Vorganges für den Abbau der Organelemente hingewiesen zu haben. Der Prozeß selbst ist den Pathologen in seinen Hauptzügen schon lange bekannt gewesen, wenn auch nicht unter diesem Namen. Handelt es sich doch bei der experimentellen Autodigestion, bei welcher die dem Organismus entnommenen Organe durch Zusatz eines Antiseptikums, z. B. durch Chloroformwasser, geschützt vor Fäulnis, bei Bruttemperatur sich selbst überlassen bleiben, um dieselben oder doch um ganz ähnliche regressive Metamorphosen, wie sie Gewebe innerhalb des lebenden Tierkörpers erleiden, wenn sie von der Zirkulation ausgeschlossen sind und dabei vor der Einwirkung von Bakterien bewahrt bleiben, so der einfache Niereninfarkt oder der Erweichungsherd im Gehirn infolge autochthoner Gefäßthrombose oder vor allem der intrauterin abgestorbene Embryo.

Außer den Pathologen hatten sich auch die Physiologen schon vor Salkowski mit dem genannten Vorgang beschäftigt. So skizziert ihn in treffender Weise Hoppe-Seyler**) 1871 als eine Maceration, identisch mit dem anatomischen Begriff der Erweichung, als eine Verflüssigung, ähnlich wie bei der Fäulnis, doch ohne Auftreten übelriechender Stoffe, als einen Prozeß, der sich mit der Wirkung der Verdauungsfermente vergleichen läßt, wobei aus Eiweißstoffen Leucin und Tyrosin, aus Fett freie Fettsäuren oder Seifen ent-

---

*) Salkowski, Über Autodigestion der Organe. Zeitschrift für klinische Medizin. 1880. 17. Suppl.

**) Hoppe-Seyler, Über Fäulnisprozesse und Desinfektion. Medizinisch-chemische Untersuchungen. 1871. Heft 4.

stehen. An dieser Stelle sind ferner auch die von Schützenberger*) begonnenen und von vielen Forschern zum Ausgang ihrer Studien genommenen Untersuchungen an der bei höherer Temperatur sich selbst überlassenen Hefe zu erwähnen, die sich auf die als Selbstgärung und Selbstverdauung bezeichneten Abbauvorgänge derselben beziehen.

Immerhin bleibt es, wie gesagt, das Verdienst Salkowskis, zuerst in systematischer Weise den chemischen Abbau der Organbestandteile, vor allem der eiweißhaltigen in Leucin und Tyrosin, und des Glykogens in Zucker, durch die postmortale antiseptische Autodigestion studiert zu haben. Von Salkowskis Schülern Schwiening**) und Biondi***) wurden dessen Versuche fortgesetzt, so bezüglich des Auftretens der Milchsäure; vor allem aber wurde die Enzymnatur des Vorgangs, die Beteiligung eines ungeformten, gelösten, von der Zelle bereiteten, aber von deren Vitalität unabhängigen Ferments sichergestellt; es wurden die, später allerdings wieder fallengelassenen, qualitativen Verschiedenheiten und die quantitativen und zeitlichen Differenzen zwischen der Autodigestion und der tryptischen Verdauung hervorgehoben, der Ersatz des Chloroforms durch andere Antiseptica, der Einfluß anderer äußerer Bedingungen, so die hemmende Wirkung zugesetzten Alkalis, studiert.

Daneben wurde von den Schülern Hofmeisters das experimentelle Studium der Autodigestion oder der Autolyse, wie dieser fermentative Abbau der Organe auf den Vorschlag Jacobys (s. u.), in Analogie mit Karyolyse, Hämolyse u. a., jetzt allgemein bezeichnet wird, eifrig betrieben und gefördert. Schon 1886 hatte Fr. Kraus†), in Hofmeisters Laboratorium die chemischen und morphologischen Veränderungen in dem Tierkörper entnommenen, aseptisch aufbewahrten Organen untersucht; er widerlegte die von Hauser angenommene Neubildung von Fett in diesen und brachte die Fragmentierung und den schließlichen Schwund des Zellkerns, die Homogenität und diffuse Tinktion des Protoplasmas in Vergleich mit der Nekrose der Pathologen. Jacoby††)

*) Schützenberger, Die Gärungserscheinungen. 1876.

) Schwiening, Über fermentative Prozesse in den Organen. Virchows Archiv. 1894. **136.

***) Biondi, Beiträge zur Lehre der fermentativen Prozesse in den Organen. Virchows Archiv. 1896. **144**.

†) Kraus, Über die in abgestorbenen Geweben spontan eintretenden Veränderungen. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 1887. **22**.

††) Jacoby, Über die fermentative Eiweißspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Zeitschrift für physiologische Chemie. 1900. **30**.

untersuchte die bei der Autolyse der Leber auftretenden stickstoffhaltigen Produkte und wies auf die während des Vorgangs erfolgende Überführung von fest gebundenem Stickstoff in locker gebundenen hin; auch unternahm er Versuche, das bei der Autolyse wirksame proteolytische Ferment zu isolieren. Siegert*) studierte, die Untersuchungen Kraus' fortführend, das Verhalten des Fettes bei der Autolyse der Gewebe. Trotz der „fettigen" Degeneration, als welche die Veränderung der Leber bei diesem Vorgange von den Morphologen bezeichnet werden müßte, war eine Vermehrung chemischen Fettes oder der Fettsäuren nicht nachzuweisen, höchstens eine Spaltung des Jecorins.

Hand in Hand mit diesen Untersuchungen wurde auch die Methodik der experimentellen Autolyse in einem wesentlichen Punkte vervollkommnet. An Stelle der ursprünglichen, antiseptischen Autolyse, wobei durch Zusatz von Chloroform oder Toluol zu dem Organbrei Fäulnis und Bakterien ferngehalten wurden, hatte Conradi**) eine einfache und zuverlässige Methode zur aseptischen Herausnahme der Organe in toto und deren aseptischer Autolyse ausgearbeitet, die den natürlichen Verhältnissen näher kam und auch in ihren Resultaten diesen mehr entsprach. Mit Hilfe dieser und der älteren Methode untersuchte Magnus-Levy***) das Verhalten der Kohlehydrate in der Leber; er fand, daß beim Abbau des Glykogens durch die Fermente des autolytischen Prozesses Milchsäure, Essigsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure, Kohlensäure, wahrscheinlich auch Wasserstoff entstehen, eine Reihe von Stoffen, die man bisher nur als Produkte des Stoffwechsels und der Lebenstätigkeit der Bakterien angesehen hatte.

Während zu den angeführten Untersuchungen fast immer nur Lebern (oder Muskeln) vom Rind, Kaninchen oder Hund benutzt worden waren, wiesen Hedin und Rowland†) die Existenz autolytischer Vorgänge auch in der Milz, den Nieren, Lymphdrüsen, Jakoby††) in der Lunge, Kutscher†††) in der Thymus, Müller im Gehirn nach, all dies in normalen Organen gesunder Säugetiere,

*) Siegert, Das Verhalten des Fettes bei der Autolyse der Leber. Diese Beiträge. 1902. 1.

**) Conradi, Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgewinnung. Ibidem.

***) Magnus-Levy, Über die Säurebildung bei der Autolyse der Leber. Ibidem 1902. 2.

†) Hedin und Rowland, Über ein proteolytisches Enzym in der Milz und im Tierkörper. Zeitschrift für physiologische Chemie. 1901. 32.

††) Jacoby, Über die Autolyse der Lunge. Ibidem 1901. 33.

†††) Kutscher, Das proteolytische Enzym der Thymus. Zeitschrift für physiologische Chemie. 1901. 34.

und studierten, wie auch kürzlich noch Levene*) am Pankreas, Reh**) an den Lymphdrüsen, die bei der Autolyse auftretenden Spaltungsprodukte.

Beiträge in gleicher Richtung, mehr oder weniger nach der praktischen Seite hin, haben Vogel***) und Schmidt-Nielsen†) geliefert. Ersterer zeigte, daß die Bildung von Muskelsaft, der hauptsächlich den Wohlgeschmack des abgelagerten Fleisches bedingt, auf einer unter Spaltung von Eiweiß einhergehenden Autolyse des Muskels, nicht auf postmortaler Fäulnis beruht; dasselbe wies Schmidt-Nielsen für den Reifungsprozeß der Pökelheringe nach, bei welchem Vorgang aus ungesättigten Fettsäuren Oxyfettsäuren gebildet und reichlich Xanthinbasen und Aminosäuren abgespalten werden. Vogel wies auch nach, daß, allerdings nur unter pathologischen Verhältnissen, die Bildung von auspreßbarem Muskelsaft, bereits im lebenden Individuum erfolgt; er faßt dies als einen autolytischen Vorgang auf.

Infolge fortschreitender Erkenntnis der biologischen Bedeutung der Autolyse haben dann auch die Pathologen und Kliniker diesem Vorgang erhöhte Aufmerksamkeit zugewandt und ihn zur Erklärung pathologischer Verhältnisse herangezogen. Die bedeutsamste Arbeit in dieser Richtung ist die von Friedrich Müller††). Er konnte bei den Lösungsvorgängen und der Verflüssigung des pneumonischen Lungeninfiltrats dieselben Zerfalls- und Erdprodukte in großer Menge nachweisen, wie sie sonst bei der postmortalen Autolyse der Organe gefunden werden. Petry†††) fand eine beträchtliche Steigerung der Autolyse im Carcinom, gegenüber dem umgebenden normalen Mammagewebe. Früher schon hatte Jacoby*†) gezeigt, daß die Phosphorleber bei

---

*) Levene, Über das Vorkommen von Uracil bei der Pankreasautolyse. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1903. **37.**

) Reh, Über die Autolyse der Lymphdrüsen. Diese Beitr. 1903. **3.

***) Vogel, Untersuchungen über Muskelsaft. Archiv für klinische Medizin. 1902. **132.**

†) Schmidt-Nielsen, Zur Kenntnis der Autolyse des Fischfleisches. Diese Beiträge. 1902. **3.**

††) Müller, Fr., Über die chemischen Vorgänge bei der Lösung der Pneumonie. Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel. 1902. **13.**

†††) Petry, Ein Beitrag zur Chemie maligner Geschwülste. Diese Beiträge. 1902. **2.**

*†) Jacoby, Über die Beziehungen der Leber- und Blutveränderungen bei Phosphorvergiftung zur Autolyse. Zeitschrift für physiolog. Chemie. 1900. **30.**

der Phosphorvergiftung viel rascher autolytisch zerfällt, als normales Lebergewebe, und daß sie schon in vivo Veränderungen erfährt, die dem autolytischen Prozeß entsprechen. Umber*) wies die Anhäufung autolytischer Abbauprodukte in der frisch gewonnenen Ascitesflüssigkeit, wo sie wie in einem sterilen Gefäß intra vitam aufgefangen und bei der verlangsamten Resorption aufgestapelt werden, nach, während Langstein und Neubauer**) am puerperalen Uterus eine Steigerung der Autolyse gegenüber dem nichtpuerperalen nicht mit Sicherheit feststellen konnten. Schumm***) analysierte die Produkte der autolytischen Eiweißspaltung in der leukämischen Milz.

Schließlich seien, um die Aufzählung der Beobachtungen über autolytische Vorgänge wenigstens einigermaßen zu vervollständigen, die Untersuchungen Conradis (s. o.) über die blutgerinnungshemmende Wirkung autolysierter Organe, im Gegensatz zu dem gerinnungsbeschleunigenden Einfluß frischer Preßsäfte und†) über die Bildung bakterizider Stoffe beim autolytischen Abbau der Organe angeführt.

Eine Isolierung des autolytischen Ferments, derart, daß man direkt mit demselben arbeiten kann, Versuche, wie sie bezüglich der dem autolytischen Ferment nahestehenden oxydativen Fermente [siehe bei Rosell††)] schon ziemlich weit vorgeschritten sind, blieben als naheliegende Aufgabe künftigen Forschungen vorbehalten.

Überblickt man die angeführten Untersuchungen über die Autolyse, so wird man in der Annahme, die schon die ersten Forscher auf diesem Gebiete hegten, aufs nachdrücklichste bestärkt, nämlich daß hier eine grundlegende Einrichtung für den Abbau der Gewebselemente vorliegt, durch die aus geformtem Zellmaterial lösliche, aus nicht diffusiblen Organbestandteilen diffusible und daher leicht eliminierbare Produkte gebildet werden, ein biochemischer Prozeß, der mit Hilfe von Fermenten vor sich geht, wohl zu trennen von der Zersetzung durch Bakterien, unabhängig

*) Umber, Über autolytische Vorgänge in Exsudaten. Münchener medicin. Wochenschrift. 1902. 49.

**) Langstein und Neubauer, Über die Autolyse des puerperalen Uterus. Ibidem.

***) Schumm, Über die Autolyse der leukämischen Milz. Diese Beiträge. 1903. 3.

†) Conradi, Über die Bildung bakterizider Stoffe bei der Autolyse. Diese Beiträge. 1902. 1.

††) Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intrazellulärer Fermente. Inaug.-Diss. Straßburg. 1901.

von der Vitalität der Zellen, das Aufhören der Zirkulation überdauernd.

Während wir bis jetzt, abgesehen etwa von Fällen von Nekrose am Lebenden, im allgemeinen nur die „postmortale“ Autolyse direkt beobachten können, weist alles oder doch vieles auf die Annahme hin, daß dieselben Umsetzungen sich auch schon innerhalb des lebenden Körpers, unter normalen wie pathologischen Zuständen abspielen, freilich unter wesentlich verschiedenen äußeren Bedingungen, und somit auch mit quantitativ ganz anderem Effekt. Bei der intravitalen Autolyse werden stets neue Moleküle zugeführt, die leicht diffusiblen, verbrauchten Produkte weggespült; stets findet Zufuhr von Sauerstoff statt, vielleicht auch ein geregeltes Ineinandergreifen einer gewissermaßen abgestuften Fermentwirkung, indes bei postmortalen Versuchen diese räumliche und zeitliche Trennung fehlt, die Produkte stagnieren, der Vorgang anaerob verläuft. Aber eben darum darf erwartet werden, daß der autolytische Prozeß unter den in vivo gegebenen Bedingungen in ebenso großem Umfange, ja in noch größerem als bei den postmortalen Experimenten, stattfindet, wenn auch seine Bedeutung für den Lebensprozeß im einzelnen noch nicht abzuschätzen ist.

Der Beitrag, den ich in folgendem zum Studium der autolytischen Vorgänge geben möchte, bezieht sich zum Teil auf physiologische Verhältnisse dieses Prozesses; vor allem aber suchte ich den Vorgang in Beziehung zu bringen mit klinischen Beobachtungen und morphologischen, pathologisch-anatomischen Untersuchungen. Schon früheren Autoren war der erhebliche Unterschied in der Größe der autolytischen Kraft ein und desselben Organs bei den verschiedenen Tieren aufgefallen, nicht nur bei verschiedenen Spezies, sondern auch individuelle Unterschiede bei derselben Art, die in Verschiedenheiten der Rasse, des Alters, des Ernährungszustandes oder der Fütterung und anderem bedingt sein mußten. Zum Teil waren diese Unterschiede qualitativer Art. So wurden bei (aseptischer) Autolyse der Leber beim Hund vorwiegend flüchtige, beim Rind überwiegend nicht flüchtige Säuren gebildet; das Kaninchen verhielt sich wie der Hund, das Schwein und die Gans wie das Rind (Magnus-Levy, l. c.). Vorwiegend aber waren die Differenzen quantitativer Art.

Zunächst suchte ich nun den Einfluß des Alters auf die Intensität der Autolyse festzustellen. Diese Versuche konnten an verschieden alten Kaninchen vorgenommen werden.

Bald dehnte ich aber die Versuche auf menschliche Leichen, auf Embryonen, Frühgeborene, Säuglinge und Kinder der ersten Lebensjahre, aus. Dabei ergab sich augenfällig, daß nicht nur das Alter, sondern auch die zum Tode führende Krankheit des Kindes zu berücksichtigen war und in Beziehung mit der Intensität des autolytischen Vorganges stand. Indem ich weiterhin mein Augenmerk namentlich auf eine Säuglingskrankheit, die Pädatrophie, richtete, konnte ich an dem klinisch, durch Wägungen, genau beobachteten Krankenmaterial auch einen wünschenswerten Aufschluß über den Einfluß des Ernährungszustandes auf die Autolyse gewinnen. Gerade bezüglich der Pädatrophie, dieser Crux der Kinderärzte, mußten Untersuchungen nach der genannten Richtung hin erwünscht sein; haben doch beim Suchen nach der Natur dieser Erkrankung weder die anatomisch-pathologischen Untersuchungen der Organe, noch die chemische Prüfung der Verdauungssäfte und der Exkrete, noch bakteriologische Studien zu durchweg befriedigenden und abschließenden Ergebnissen geführt.

Es schien nicht aussichtslos, hier einen neuen Weg, das Studium der mit der Verdauung nicht in Zusammenhang stehenden intra vitam tätigen Fermente einzuschlagen.

Untersuchungsmethode.

Bevor ich die Methodik meiner Untersuchungen bespreche, habe ich einiges über das benutzte Leichenmaterial zu sagen. Erste Bedingung bei allen Versuchen über autolytische Vorgänge ist, daß Fäulnisvorgänge von vornherein und während des Versuches selbst mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Da diese in gleicher Weise und noch viel stärker wie die Autolyse eine proteolytische oder sonstige hydrolytische Wirkung entfalten, können sie die Resultate der letzteren geradezu unkenntlich machen. Deshalb war ich auf die Fälle aus meiner eigenen Poliklinik angewiesen, wo mir die Sektionen schon bald nach dem Tode gestattet wurden, und ich die Organe nicht selten noch warm aus der Leiche entnehmen konnte.

Selbstversändlich konnte für meine Versuche nur die antiseptische Methode der Autolyse, wo durch Toluolzusatz Bakterienentwickelung und Fäulnis ferngehalten wurden, in Betracht kommen.

Das aseptische Verfahren, bei dem die Organe, unter antiseptischen Kautelen aus dem eben getöteten Tierkörper entnommen, aseptisch aufbewahrt werden, läßt schon, und gerade bei der Leber (Conradi, l. c.), im vorzüglich eingerichteten Laboratorium zuweilen im Stich; in dem ärmlichen Milieu poliklinischer Patienten, wo ich die Sektionen vornehmen mußte, ist dieser Modus ganz und gar undurchführbar.

Es erschien wünschenswert, um die Beeinträchtigung der Autolyse durch das zugesetzte Antiseptikum so gering als möglich zu gestalten, durch eigene Versuche das Minimum der zur Fernhaltung von Fäulnis und zur Entwickelungshemmung bereits vorhandener Bakterien notwendigen Toluolmenge ausfindig zu machen*).

Bei 6—12 Stunden (bis 18 und 24 Stunden im Winter) nach dem Tode vorgenommenen, sauber, wenn auch nicht aseptisch ausgeführten Sektionen genügen für 3 Gramm Leberbrei, verteilt in 30 ccm sterilem Wasser und aufbewahrt in sterilen Reagensgläschen, 0,3 ccm Toluol, um mit Sicherheit die vorhandenen Bakterien nicht nur in ihrer Vermehrung aufzuhalten, sondern sie auch abzutöten. Insoweit decken sich meine Untersuchungen mit denen Salkowskis. Ob aber bei mehrere Tage langem Zwischenraum zwischen Tod und Sektion auch diese geringe Toluolmenge zur Abtötung der Bakterien genügt, dessen bin ich nach einem entsprechenden Fehlversuch**) nicht sicher.

Man hätte als Antiseptikum auch statt Toluol das von Salkowski***) zu Fermentstudien empfohlene Chloroform anwenden können. Das im

---

*) Bei den bakteriologischen Untersuchungen durfte ich die Hülfsmittel des hiesigen Instituts für Hygiene und Bakteriologie benutzen, wofür ich Herrn Professor Forster auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank ausspreche.

**) Es seien folgende 2 Versuche — Fehlversuche — angeführt. Die Sektion der an Enteritis und Pneumonie verstorbenen Säuglinge fand 24 bezw. 30 Stunden nach dem Tode statt; während dieser Zeit waren die Leichen in der Wohnstube aufgebahrt gewesen. Nach der Sektion wurden — aus äußeren Gründen — die Lebern im Eisschrank während 6 Stunden aufbewahrt, dann verarbeitet. Aus 2,5 mg des in 30 ccm 1-prozentigem Toluolwasser verteilten 3 g Leberbreies entwickeln sich auf Gelatine nach 48 Stunden

	I	II	
aus dem frischen Präparat ohne Toluol	390	320	Kolonien
nach 3tägiger antiseptischer Autolyse	440	10	„
„ 5 „ „ „	zahllose	13	„

Die Entwickelung der Kolonien im II. Versuch mag auf irgend einem technischen Fehler beruhen. Der erste Versuch ist ein ausgesprochener Fehlversuch, wenngleich er noch eine Hemmung der Bakterienentwickelung durch das Toluol erkennen läßt. Sitzen schon reichlich Bakterien im Innern der kleinsten Gewebsteile, so werden sie eben trotz häufigen Durchschüttelns von dem Toluol kaum mehr erreicht. Ungeachtet des Fehlens von Fäulniserscheinungen habe ich der bakteriologischen Resultate wegen diese Fälle als hinsichtlich der Ergebnisse der Autolyse nicht einwandsfrei aus meiner Zusammenstellung gestrichen.

Bei den übrigen Versuchen blieben die angelegten Kulturen stets steril.

***) Salkowski, Über die antiseptische Wirkung des Chloroformwassers. Deutsche medicin. Wochenschrift 1888. 14.

hiesigen Institut an dessen Stelle benutzte Toluol bietet bei gleicher chemischer Indifferenz vor dem Chloroform den Vorteil, daß sich sein Überschuß auf der Oberfläche der wässerigen Flüssigkeit ausbreitet und so einen willkommenen Abschluß gegen das Eindringen von Schimmelpilzen und anderen Bakterien abgibt und überdies bei etwas geringerer antiseptischer Tiefenwirkung den autolytischen Prozeß vielleicht noch weniger stört als letzteres.

Sämtliche Versuche wurden, wie schon angedeutet, an der Leber, diesem klassischen Objekt für autolytische Untersuchungen, vorgenommen. Als Maßstab für die Wirkungsintensität des autolytischen Ferments diente die Zunahme des „nicht koagulablen Stickstoffs", d. h. des Stickstoffs, der nicht koagulablen N-haltigen Substanzen nach Vollendung der Autolyse, gegenüber der Menge desselben im frischen Präparat. Es wurde also bei jedem einzelnen Falle in einer bestimmten Lebermenge zuerst im frischen Zustande, vor der Autolyse, dann nach Vollendung derselben der Stickstoffgehalt des bei Eiweißkoagulation resultierenden Filtrats nach Kjeldahl ermittelt. Außerdem wurde in jedem Falle die Menge des Gesamtstickstoffs bestimmt, die sich allerdings durch die Autolyse nicht verändert, aber den einzig sicheren Maßstab abgibt für die Menge des dem autolytischen Ferment zur Bearbeitung verfügbaren Materials. Dies ist hier besonders wichtig, wo das Material nicht, wie bei den Tierexperimenten, unmittelbar nach dem Tode verarbeitet werden kann, wo vielmehr in der zwischen Tod und Autolyse verstreichenden Zwischenzeit die Autolyse in nicht kontrollierbarem Umfange vor sich geht. — Außerdem machte ich immer Stickstoffbestimmungen am 3. oder 4. Versuchstage, um ein Urteil über die Intensität der Wirkung des autolytischen Ferments zu gewinnen.

Man kann zu den Versuchen den durch ein Koliertuch gepreßten Lebersaft oder feingewiegten, zerhackten und zerriebenen Leberbrei verwenden. Manche Autoren zerreiben die Leber mit Quarzsand, um die Zertrümmerung der Zellen zu verstärken und dadurch den Austritt des Ferments zu erleichtern. Pfaundler*) sucht außerdem durch einen Zusatz von Pepsin das Freiwerden des (nicht diffusiblen) Ferments aus den Zellen zu begünstigen; letzteres war bei den vorliegenden Versuchen unstatthaft.

Die Verarbeitung von Leberbrei gibt etwas größere Werte für die Menge des in Lösung gegangenen Eiweißes als die von Leber-

*) Pfaundler, Über Stoffwechselstörungen bei magendarmkranken Säuglingen. Jahrbuch für Kinderheilkunde, 1901, 54.

saft, namentlich in dem „frischen" Präparat. Die Unterschiede gehen aus der Gegenüberstellung folgender Versuchsreihen an Kaninchenlebern hervor. Der Stickstoffgehalt der nicht koagulablen Substanzen ist — hier wie in den anderen Tabellen — immer auf 1 Gramm Leberbrei bezw. Lebersaft umgerechnet.

	Brei	Saft	Brei	Saft
vor der Autolyse . . .	0,00483	0,00264	0,00264	0,00210
nach 48stündiger Autolyse	0,00546	0,00420	0,00525	0,00410
„ 96 „ „	0,00546	0,00433	0,00516	0,00449

Ich benutzte zu den späteren Versuchen immer nur zerhackten und fein zerriebenen Leberbrei.

Über die Dauer des autolytischen Prozesses, besonders bei dem antiseptischen Verfahren, bestehen widersprechende Angaben. Magnus-Levy (l. c.) gibt an, daß er nicht nur Wochen, sondern Monate lang fortdauere, im Gegensatz zu dem aseptischen Verfahren, das stets schon nach Tagen zum Abschluß komme. Sehr viel kommt es hierbei wohl auf die Einzelheiten der Versuchsanordnung an. Während die meisten Autoren große Substanzmengen, 100, ja 500 Gramm, vermischt mit dem doppelten Volumen Wasser, in einer Portion, diese reichlich mit Toluol überschichtet, der Autolyse überließen, teilte ich das Material, zum Teil schon aus äußeren Gründen, in kleine Portionen von je 3 Gramm, bei den neugeborenen Kaninchen in noch kleinere und verteilte diese im 10fachen Volumen 1-proz. Toluolwassers. Bei dieser Versuchsanordnung läuft der Prozeß auch der antiseptischen Autolyse in etwa einer Woche oder noch früher ab.

Nach 12 oder 24stündigem Stehen der beschickten Röhrchen im Brutschrank ist die Autolyse schon so weit vorgeschritten, daß die ursprünglich roten, festen Leberpartikelchen nur mehr blaßrot oder ganz entfärbt, halbweich sind; ursprünglich am Boden liegend, schwimmen sie bereits in der jetzt dick getrübten Flüssigkeit, während das überschüssige Toluol einen dicken weißen oder grauen Überzug bildet. Am 2. oder 3. Tage sieht man im mikroskopischen Präparat nur mehr gelbe Klumpen von zerfallenen Leberzellen, dazwischen spärliche Tyrosinbüschel. Die Flüssigkeit färbt sich rötlich und setzt unter Klärung einen geringen Bodensatz ab. Die Reaktion wird ganz schwach sauer. Ausstriche auf Nährböden zur bakteriologischen Untersuchung bleiben steril.

Die Kurve der Stickstoffmengen, welche den durch die Auto-

lyse in Lösung gegangenen, nicht mehr durch Kochen nach Essigsäurezusatz koagulablen Substanzen entsprechen, kommt, nach unserer Versuchsanordnung, am 3. oder 4. Tage dem Scheitel meist schon recht nahe, und hat ihn am 5. oder 6. Tage immer oder doch fast ausnahmslos erreicht, um weiterhin sogar nicht selten wieder etwas abzusinken.

Eine Erklärung für diese *schließliche Stickstoffabnahme*, die größer ist, als daß sie innerhalb der Fehlergrenzen läge, und häufiger, als daß sie unerwähnt bleiben könnte, muß ich schuldig bleiben. Die Annahme, daß schließlich Tripelphosphat ausfällt, wodurch ein Stickstoffverlust in der Lösung zustande käme, kann nicht zutreffend sein, da um diese Zeit die Flüssigkeit stets sauer reagiert.

Folgende Versuchsreihen an Kaninchen mögen als Paradigmen der verschiedenen Kurven dienen. In 1 ccm Leber waren enthalten:

		Ausgewachsene Kaninchen.		Neugebor. Kaninchen
Gesamt-N		0,01386	0,02373	0,01120
N der nicht koagulablen Substanzen. vor der Autolyse . . .	0,00264	0,00210	0,00483	0,00672
Nach 24stündiger Autolyse		0,00421	0,00462	
„ 48 „ „	0,00420	0,00546	0,00546	
„ 72 „ „			0,00756	
„ 96 „ „	0,00433	0,00546	0,00546	0,01134
„ 120 „ „				0,00966
„ 144 „ „	0,00449			

Geht man noch mehr auf Einzelheiten ein, so kann man die Bemerkung machen, daß dort, wo durch die Autolyse viel Eiweiß in Lösung geht, dies langsamer erfolgt als da, wo der Prozeß keine große Wirkung entfaltet, so daß also die Kurven der Autolyse immer einen ziemlich parallelen Verlauf nehmen, bald früher, bald später ihren Höhepunkt erreichend. Diese Wahrnehmung stützt sich namentlich auf zahlreiche Beobachtungen an menschlichem Leichenmaterial.

Was die mit der Zeit eintretende *Verlangsamung* und das endliche *Aufhören* der *Lösung* von Eiweiß resp. stickstoffhaltigen Substanzen bewirkt, ist nicht so ganz leicht zu sagen. Ein Aufbrauchen der verfügbaren Substanz durch das Ferment findet nur in den allerseltensten Fällen statt, z. B. bei dem neugeborenen Kaninchen. Am nächsten liegt die Annahme einer Erschöpfung des Ferments durch den autolytischen Prozeß selbst oder eine Hemmung seiner Wirksamkeit durch die gebildeten

Produkte. Die Schädigung durch das Antiseptikum dürfte nicht ausschlaggebend sein. Keinesfalls hemmt die bei der Autolyse auftretende schwache Säuerung der Flüssigkeit den Prozeß, wie dies z. B. bei der bakteriellen Säurebildung der Fall ist; denn gerade bei schwach saurer Lösung entfaltet das autolytische Ferment seine stärkste Wirkung, während die Alkaleszenz einen proportional ihrer Stärke hemmenden Einfluß ausübt (Schwiening l. c.).

Im folgenden sei, der Übersichtlichkeit halber, die ganze Versuchsanordnung in ihren wesentlichen Punkten zusammengefaßt:

Nach Herauspräparieren der großen Gefäße wurde die Leber resp. Stücke derselben, fein zerhackt, im Mörser zerrieben und in zahlreichen Portionen à 3 Gramm abgewogen. In 2 Portionen wurde die Gesamtstickstoffmenge nach Kjeldahl bestimmt. Alle übrigen wurden in weite, sterile Reagensröhrchen gebracht, mit dem 10fachen Volumen destillierten Wassers und 0,3 ccm Toluol versetzt und gut verkorkt im Brutschrank bei ca. 35° C aufgestellt, wo sie täglich mehrmals gut durchgeschüttelt wurden. 2 Portionen wurden frisch verarbeitet. Sie wurden nach Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion und von 1 ccm einer 2-proz. Kaliummonophosphatlösung zum Sieden erhitzt und auf etwa 20 ccm eingedampft, dann filtriert. Infolge des Zusatzes von KH_2PO_4 erfolgt das Filtrieren, das ohne dieses bei den frischen Lösungen sehr lange Zeit in Anspruch nimmt, überaus rasch. Das Filtrat der frischen oder halb autolysierten Breiproben ist opaleszent bis trübe, gelbgrau, das der späteren Lösungen klar, gelblich. In diesen Lösungen wurde nun gleichfalls der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, und zwar wurden verarbeitet außer den frischen Präparaten solche, die 3, 5, 7 Tage, manchmal noch längere Zeit im Brutschrank gestanden waren. Bei allen Versuchen wurden ausnahmslos Kontrollbestimmungen ausgeführt, und in den meisten Fällen wurde die Sterilität der Präparate durch bakteriologische kulturelle Untersuchungen sichergestellt.

Einfluß des Alters auf die autolytischen Vorgänge.

I. Versuche an Kaninchen.

An diesem Material mußte sich dieser Einfluß am leichtesten studieren lassen, besonders wenn man, um Rasseneigentümlichkeiten zu vermeiden, Tiere desselben Stammes, ja, wie in der folgenden Tabelle, desselben Wurfes benutzte. Von vornherein war anzunehmen, daß sich der Vorgang bei jugendlichen Tieren sehr viel lebhafter gestalten würde als bei alten. Sind doch die ersteren in so vielen anderen Umsetzungsprozessen, eben bezüglich ihrer ganzen Vitalität, den letzteren überlegen; und selbst den Verdauungsfermenten, die ja nur mit einiger Reserve mit diesen inneren Organfermenten verglichen werden dürfen, scheint nach den neueren Untersuchungen [Moro*)] schon bei ganz jungen

*) Moro, Diastat. Enzym in den Stühlen von Säuglingen. Jahrbuch f. Kinderheilkunde. 1898. 47.

Säuglingen eine größere Wirksamkeit zuzukommen, als man bisher allgemein anzunehmen geneigt war. — Indes stellte sich bald heraus, daß zwischen großen, ausgewachsenen Kaninchen und jungen, aber doch schon einige oder auch nur einen Monat alten Tieren kein oder kaum ein ausgesprochener oder gar konstanter Unterschied nach der erwarteten Richtung hin bestand. Dieser trat vielmehr erst dann zutage, als ich auf ganz junge Individuen, auf neugeborene oder wenige Tage alte Tiere zurückgriff.

Alter des Kaninchens:	alt	Muttertier d. übrigen	18 Tage	8 Tage	1 Tag	1 Tag
Gewicht d. Leber in gr:	120	150	5,6 g	6,0	5,5 2 Lebern zusammen.	4,5
Gesamt-N		0,02373	0,01386	0,01701	0,01232	0,01120
N der nicht koagulablen Stoffe						
vor der Autolyse	0,00265	0,00483	0,00210	0,00819	0,00739	0,00672
nach 2täg. Autolyse	0,00420	0,00546	0,00546	0,00882		
„ 4 „ „	0,00433	0,00756	0,00546	0,00966	0,01247	0,01134
„ 6 „ „	0,00449	0,00546		0,01266	0,01062	0,00966
Stickstoffmenge der in Lösung gegangenen Stoffe, ausgedrückt in Prozent vom Gesamtstickstoff						
vor der Autolyse		20,4	15,2	48,2	60,1	60,0
nach 2täg. Autolyse		23,0	39,5	51,9		
„ 4 „ „		31,9	39,5	56,8	100,0	100,0
„ 6 „ „		23,0		74,4	86,3	86,2

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wurde bei den Lebern von eintägigen Tieren die ganze verfügbare Menge stickstoffhaltiger Substanzen, die ja allerdings in derselben Gewebsmenge nur halb so groß war wie bei alten Tieren, im Laufe von 4 Tagen in nicht mehr durch Hitze koagulable Stoffe umgewandelt und bei einem 8tägigen Tiere wurden noch drei Viertel des Gesamteiweißes gelöst. Das 18 Tage alte Kaninchen nähert sich mit der Lösung von zwei Fünfteln des Gesamteiweiß schon sehr dem ausgewachsenen Muttertier, wo nur ein schwaches Viertel der verfügbaren Eiweißmenge in Lösung ging, wie denn auch dieses Tier sich hinsichtlich anderer fermentativer Prozesse, z. B. bezüglich der Blutgerinnung, bereits ganz wie ein erwachsenes verhielt.

Es ist also bei den neugeborenen Kaninchen die Autolyse so intensiv, als sie nur sein kann, maximal, und auch beim 8tägigen noch sehr viel stärker als später, während weiterhin die Intensität sehr rasch abnimmt, so daß schon bei 1 oder 2monatlichen Tieren kein konstanter Unterschied mehr besteht gegenüber ausgewachsenen und alten Individuen.

Auch schon in den frisch, das heißt vor der Einwirkung der postmortalen Autolyse, untersuchten Lebern ist bei dem 8tägigen und 1tägigen Kaninchen die Ziffer des gelösten Eiweißes eine sehr hohe, 60 Proz. gegenüber 15—20 Proz. bei den alten Kaninchen, was wohl auf die Lebhaftigkeit des entsprechenden intravitalen Prozesses zurückgeführt werden darf. (Bei dieser Gelegenheit sieht man auch deutlich, wie wichtig es ist, nicht nur die Menge des in Lösung gegangenen Eiweißes vor und nach der Autolyse mit einander zu vergleichen, sondern die Zahlen auch in Beziehung zu setzen mit der Gesamteiweißmenge.)

Schließlich steigt die Kurve der autolytischen Wirkung beim jungen Tiere nicht nur höher, sondern auch im allgemeinen rascher an und nähert sich ihrem Gipfel früher als beim alten. All dies ist, wie gesagt, wohl auf die energischeren Umsetzungsprozesse im jugendlichen und besonders im neugeborenen Organismus zurückzuführen. Den Einwand, daß beim älteren Kaninchen eine stärkere Bildung von Bindegewebe, das an der Autolyse nicht in dem Maße beteiligt ist wie die Parenchymzellen, das Minus der in Lösung gehenden stickstoffhaltigen Substanzen bedinge, kann ich auf Grund mikroskopischer Untersuchungen zurückweisen. Die Unterschiede in dieser Richtung sind sehr unbedeutend.

Ich darf übrigens bei der Wiedergabe der Resultate dieser Untersuchungsreihen nicht die Bemerkung unterlassen, daß die Ergebnisse aller dieser Untersuchungen keineswegs ganz mit einander übereinstimmen, daß es vielmehr auch nicht an einzelnen Beobachtungen fehlt, die sich mit den oben angeführten nicht in Einklang bringen lassen. So erwies sich bei der Leber eines 8tägigen Kaninchens die autolytische Wirkung fast gleich Null, trotz mehrfacher Nachuntersuchungen. Es fehlt somit auch hier nicht an individuellen Abweichungen, ebenso wenig wie in den anderen Gruppen meiner Untersuchungsreihen; aber es handelt sich dabei eben doch nur um Ausnahmen.

II. Untersuchungen an menschlichen Föten und Frühgeborenen*).

Von hohem Interesse ist in dieser Gruppe vor allem die Menge der gelösten stickstoffhaltigen Substanzen im „frischen“ Präparat, vor der experimentellen Autolyse, wofür folgende 3 Fälle als Paradigmen dienen mögen:

---

*) Dieselben wurden mir gütigst von Herrn Professor Fehling, Direktor der Universitätsfrauenklinik, überlassen, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

		Totgeboren im 4. Monat. Tod einige Zeit vor der Geburt. Leber 10 g schwer. Periarteriitis, auf Lues verdächtig. Reichlich kernhaltige Blutkörperchen in den Capillaren (Blutbildung).	Totgeboren im 6. Monat. Lebte noch 6 Stunden vor der Geburt. Leber 56 g schwer. Häufchen intravaskulärer kernhaltiger Blutkörperchen.	Lebendgeboren im 6. Monat. Lebte 6 Stunden lang nach der Geburt. Leber 54 g schwer. Normaler Befund.
Gesamt-N		0,02716	0,02870	0,02436
vor der Autolyse	Stickstoff der nicht koagulablen Stoffe	0,00798	0,00420	0,00252
nach „ „		0,01722	0,00644	0,00902
Stickstoffmenge der in Lösung gegangenen Stoffe, ausgedrückt in Proz. vom Gesamtstickstoff				
vor der Autolyse		29,3	14,6	10,3
nach „ „		63,3	22,4	36,9
Ende d. Autolyse in Stunden		72	96	144

In dem ersten Falle, einem Fötus, der augenscheinlich schon einige Zeit vor der Geburt abgestorben war (bei dem Eintritt der Mutter in die Klinik waren die kindlichen Herztöne nicht mehr zu hören, die Geburt des frisch aussehenden Kindes erfolgte 8 Stunden später, und unmittelbar darauf wurde die Leber verarbeitet,) war die Menge der in Lösung gegangenen stickstoffhaltigen Substanzen im „frischen“ Präparat eine außerordentlich hohe, höher als je sonst bei einer menschlichen Leiche. — Das 2. totgeborene Kind war etwa 6 Stunden vor der Geburt gestorben. Seine Leber wies mittlere bis kleine Werte nicht koagulablen Eiweißes auf. Das 3. Kind, wie das 2. eine Frühgeburt im 6. Monat, lebte etwa 6 Stunden lang; hier war die entsprechende Eiweißmenge außerordentlich gering, fast die geringste je beobachtete.

Diese Verschiedenheiten erklären sich leicht aus folgender Erwägung: Im ersten Falle war die Autolyse bereits in utero in beträchtlichem Maße vor sich gegangen, daher die großen Werte im „frischen“, faktisch gar nicht mehr frischen Präparat. Um Fäulnis handelte es sich hier nicht; das Organ machte einen durchaus frischen Eindruck und wurde auch unmittelbar nach der Geburt verarbeitet. — Bei dem zweiten Falle konnte begreiflicherweise in den wenigen Stunden vor der Geburt die Autolyse nicht diesen Effekt erzielen. — Bei der dritten Beobachtung handelte es sich um einen wirklich frischen Fall und überdies, wie bei den anderen, um eine unentwickelte Frucht; darum sind hier die Werte der bei der intravitalen Autolyse gelösten N-haltigen Substanzen besonders niedrig ausgefallen.

Aus dem Vergleich dieser 3 Fälle untereinander gewinnen wir ein gutes Bild von dem intravital im Mutterleib an den abgestorbenen Föten sich abspielenden autolytischen Vorgängen, und indem man von der Leber auf die anderen Organe und die ganze Frucht Schlüsse ziehen darf, erhalten wir hier eine exakte Vorstellung von den Umwandlungsprozessen und natürlichen Abbauvorgängen in diesen toten Föten.

Mit der obigen Erwägung steht auch in sehr gutem Einklang das Resultat der Dauer der experimentellen Autolyse in dem einzelnen Falle. Das Ende des autolytischen Prozesses, nach dem kein Eiweiß mehr in Lösung ging, war im ersten Falle schon nach 72 Stunden, im zweiten nach 96 Stunden, im dritten erst nach 144 Stunden erreicht. Je kürzere Zeit also der autolytische Prozeß in vitro anhielt, um so länger hatte er vorher schon in utero bestanden, und die Verkürzung in der zeitlich zweiten Phase ist auf Kosten der vorangehenden zu setzen. Es dürfte sich verlohnen, all diese Befunde an einer größeren Versuchsreihe sicherzustellen. Vielleicht gibt uns das Studium der Autolyse bei totgeborenen Früchten Anhaltspunkte für die genauere Beurteilung der Zeit des Absterbens vor der Geburt.

Betrachten wir schließlich die absolute Menge der durch die Autolyse gelösten N-haltigen Stoffe selbst, so finden wir bei dem zweiten und dritten Falle sehr geringe Werte, die ganz erheblich sowohl unter dem Mittel der Lebern junger Kaninchen als auch unter dem der Lebern menschlicher Säuglinge liegen. Man könnte annehmen, daß bei diesen nicht ausgetragenen, nicht voll entwickelten Früchten das proteolytische Ferment der Autolyse nur in geringer Menge vorhanden ist oder weniger stark wirkt, eine Annahme, die manches für sich hat. Doch bei dem ersten Falle, gerade dem am wenigsten entwickelten Fötus, liegen die Verhältnisse ganz anders; hier ist die Menge des bei der Autolyse gelösten Eiweißes eine beträchtliche. Diese Verhältnisse bedürfen der Nachprüfung. Erinnert man sich der, schon makroskopisch leicht anzustellenden Beobachtung und allbekannten Erfahrung betreffs der so rasch und leicht erfolgenden Erweichung und Verflüssigung embryonaler Organe, so ist man versucht, gerade den letzten Befund für normal und typisch zu halten.

III. Untersuchungen an Kindern.

Diese Untersuchungen sind, im Gegensatz zu der vorigen Gruppe, zahlreich genug angestellt, — systematisch an 14 Kindern (siehe die Krankengeschichten, Sektionsbefunde und Versuchsprotokolle am Schluß der Arbeit), dazu kommt noch eine größere

Zahl Einzelbeobachtungen, — um nach verschiedenen Richtungen hin zu bestimmten Schlußfolgerungen zu gelangen. Doch fehlte es mir leider gerade an ausgetragenen Säuglingen des 1. Lebensmonats, an denen die bei den Kaninchen gefundene Beobachtung, die bedeutende Steigerung der Intensität des autolytischen Prozesses in der ersten Lebenswoche gegenüber dem späteren Alter hätte untersucht werden können. — Allerdings konnte man daran denken, daß bei dem sich in jeder Beziehung langsamer entwickelnden menschlichen Individuum diese Differenz auf einen längeren Zeitraum, auf Monate, ausgedehnt ist.

Die 14 Kinder standen im Alter von 2 bis 28 Monaten, drei Fünftel von ihnen waren Säuglinge unter einem Jahr. Indes ein auch nur einigermaßen konstanter oder gesetzmäßiger Unterschied der einzelnen Fälle, diese nach dem Alter miteinander verglichen, ließ sich in keiner Weise feststellen: Regellos begegnet man in den aufeinander folgenden Lebensmonaten den verschiedensten, die Intensität der Autolyse zum Ausdruck bringenden Zahlen, und man kommt sofort zur Überzeugung, daß entweder schon im frühesten Kindesalter, um nicht zu sagen im allerfrühesten, ein Unterschied nach dieser Richtung hin nicht mehr besteht, oder daß die Differenzen in dieser Hinsicht durch andere Einflüsse vollkommen verwischt werden.

Diese Beobachtungen zeigen keine Analogie mit den Befunden Pfaundlers (l. c.) bezüglich des oxydativen Ferments der Leber. Sein Material umfaßte vorwiegend Säuglinge des ersten Halbjahres. 7 von den 45 Kindern waren aber über 6 Monate alt. Die Lebern der letzteren waren, soweit keine pathologischen Veränderungen vorlagen, durch eine beträchtlich höhere oxydative Energie ausgezeichnet, und Pfaundler schließt daraus, daß die oxydative Energie der Organe mit zunehmendem Alter steil ansteige. Eine ähnliche Beziehung konnte ich nach dem Gesagten bezüglich des proteolytischen Ferments der Autolyse nicht finden; eine solche würde auch mit meinen Befunden an Kaninchen in direktem Widerspruch gestanden haben.

Einfluß pathologischer Zustände auf die Autolyse.

Den größten Einfluß auf die Intensität des autolytischen Prozesses übt, nach dem fast ausnahmslosen Zutreffen dieses Moments zu schließen, das Verhalten des Körpergewichts des Individuums aus, und zwar dieses in Relation zu dem Alter des Individuums oder, bestimmter ausgedrückt, die Körpergewichtsabnahme kürzere oder längere Zeit vor dem Tode. Je stärker die Körpergewichtsabnahme war, um so geringer fiel die Wirkung des autolytischen Ferments aus. Dies illustriert die folgende Tabelle, in der die Fälle, nach dem Verhältnis ihres Körpergewichts zu dem für das betreffende Alter normalen Durch-

schnittsgewicht geordnet, in 4 Gruppen untergebracht sind. Da fast alle Kinder bis kurz vor ihrem Lebensende gewogen worden waren, ließ sich sowohl der Grad wie auch die Schnelligkeit der Körpergewichtsabnahme, beziehungsweise das Ausbleiben der Zunahme, immer gut feststellen.

Körpergewicht in Proz. des für das betr. Alter normalen Durchschnittsgewichts.	Durchschnittsergebnis der Autolyse, in Proz. des N der durch die Autolyse in Lösung gegangenen Stoffe vom Gesamt-N ausgedrückt.
I. 71—90	53
II. 61—70	48
III. 51—60	40
IV. 31—40	27

Der Unterschied ist ein ebenso deutlicher wie regelmäßiger. Da es sich gerade bei den hochgradig und zum Skelett abgemagerten Kindern der III. und IV. Gruppe vorzüglich um atrophische, athreptische Säuglinge handelte, so kann man auch ohne weiteres den Satz aufstellen: Je hochgradiger die Atrophie, um so geringer der Effekt der Autolyse. Dabei handelt es sich anscheinend vor allem um einen Mangel an autolytischem Ferment; denn der andere hier in Betracht kommende Faktor, das dem Ferment zur Verfügung stehende Gesamteiweiß, weist gerade bei den höchsten Graden von Pädatrophie mit den geringsten Werten der Autolyse infolge Wasserverarmung der Gewebe die höchsten Zahlen auf. Aus letzterem Grunde werden die prozentualen Zahlen, die den Stickstoff der in Lösung gegangenen Stoffe in Beziehung zum Gesamtstickstoff bringen, noch eklatanter, als es schon die absoluten Werte sind.

Nächst den Fällen von chronischer Pädatrophie mit monatelangem, beträchtlichem Körpergewichtsdefizit weisen mehr oder weniger weit unter dem Durchschnitt liegende Werte der Autolyse jene Fälle auf, bei denen erst kurze Zeit vor dem Tode, während einer akuten Krankheit eine beträchtliche Gewichtsabnahme stattgefunden hatte. Dies gibt die Veranlassung zu einer Ordnung der Fälle nach der klinischen Diagnose, und da ergibt sich ohne weiteres, daß die Lebern bei akuter und chronischer Gastroenteritis, bei Verdauungsstörungen, erheblich niedrigere Werte der Autolyse aufweisen, als bei Pneumonieen und anderen Respirationskrankheiten.

Immerhin ist die Scheidung keine so scharfe, wie dies oben bezüglich der Körpergewichtsabnahme der Fall war. Es macht sich

vor allem der Einfluß des letzteren Moments in ausschlaggebender Weise geltend. Bei einigen Fällen stand die Pneumonie im Vordergrund des klinischen Krankheitsbildes, während sie bezüglich der Werte der Autolyse mehr den Verdauungskrankheiten entsprachen. Da war nun entweder die Bronchitis mit Enteritis kompliziert, oder neben der Pneumonie bestand eine schwere Atrophie oder eine solche hatte bis vor kurzem bestanden. Auch dieser letzte Umstand darf mit zur Erklärung für das Verhalten der Autolyse herangezogen werden; denn in Analogie mit anderen Vorgängen ist es nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, daß eine während vieler Monate bestehende schwere Atrophie auch noch über die Dauer der eigentlichen Krankheit hinaus einen hemmenden Einfluß auf die Bildung des autolytischen Ferments ausübt, wie es auch genug Fälle von Pädatrophie gibt, die ohne noch fortbestehende Infektion und Intoxikation, trotz einer wenigstens scheinbar, auf Grund der Fäcesuntersuchungen, bekömmlichen und ausreichenden Nahrung zum tödlichen Ausgang kommen. Doch ist nicht anzunehmen, daß diese Erklärung für alle Fälle zutrifft. Dies zeigt die Beobachtung 1 (hohe Werte der Autolyse bei akuter Pneumonie und chronischer Atrophie).

Es ist eine lange bekannte Tatsache, daß die Verdauungsfermente bei Erkrankungszuständen des Verdauungsapparates erheblich an Leistungsfähigkeit einbüßen. Hier ist der Nachweis erbracht, daß auch ein mit der Verdauung nicht in Beziehung stehendes inneres Organferment bei Erkrankung des Gastrointestinaltraktus bedeutend an Wirksamkeit verliert. Möglicherweise wird letzteres dabei sogar noch mehr geschädigt als die Verdauungsfermente, die durch ihre Anpassungsfähigkeit wieder leichter zu vollerer Leistungsfähigkeit angeregt werden können. Hierin, in dem trägeren, unvollkommeneren, ja vielleicht unmöglichen Ersatz der inneren Organfermente, wenn sie erst einmal zum großen Teil verloren gegangen sind, liegt ein bedeutsamer und für die Prognose des Falles schwer wiegender Unterschied, gegenüber dem Schwund der leichter und selbst auf künstlichem Wege ersetzbaren Verdauungsfermente.

Ist diese Herabsetzung der Wirksamkeit des autolytischen Ferments eine primäre oder sekundäre Erscheinung? Bei dem gegenwärtigen Stand der Fermentlehre, wo die Fermente, die sekretorischen wie die intrazellularen, allenthalben in den Vordergrund treten, wird man geneigt sein, eine primäre Beeinträchtigung der Fermentwirkung anzunehmen, ganz besonders bei der Pädatrophie, die sich immer mehr als eine funktionelle Erkrankung herausstellt.

Die höchsten Werte der Autolyse zeigten, von dem angeführten Fall 1 abgesehen, ein Fall von tuberkulöser Meningitis und ein solcher von kongenitalem Herzfehler, also Krankheiten, bei denen der hemmende Einfluß auf die Fermentbildung und

Fermentwirkung wohl nur ein geringer war. — Ich schließe diese Betrachtung mit einer Zusammenstellung der Fälle nach der klinischen Diagnose, an der das eben Gesagte gut illustriert wird:

Klinische Diagnose.	N der durch die Autolyse gelösten Stoffe, in Proz. vom Gesamt-N.
I. Meningitis. Vitium cordis . .	66. 60.
II. Pneumonie, zum Teil bei Pertussis	78. 57. 50. 43. 41.
III. Pneumonie kombiniert mit Enteritis oder Atrophie . . .	33. 32. 23.
IV. Reine Verdauungskrankheiten	39. 33. 27. 19.

Gegenüber dem Einfluß der Körpergewichtsabnahme auf die Intensität des autolytischen Prozesses treten die übrigen Momente in den Hintergrund. Wenn z. B. die Brustkinder fast durchweg (Ausnahme Fall 5) in dieser Beziehung viel höhere Werte aufweisen als die Flaschenkinder, 66, 60, 57 Proz. gegenüber 39 bis 19 Proz. (Ausnahme Fall 5 mit 50 Proz.), so ist dies sicher vielmehr mit dem besseren Ernährungszustand der ersten Kategorie in Zusammenhang zu bringen als etwa mit der Annahme einer Übertragung dieses Ferments zusammen mit anderen Fermenten durch die Muttermilch auf den Säugling.

Es lag des weiteren der Gedanke nahe, die anatomisch-pathologischen Veränderungen in der Leber, wie sie die makroskopische und mehr noch die mikroskopische*) Untersuchung der Organe ergab, in Beziehung und Vergleich zu bringen mit der Intensität des autolytischen Prozesses. Da zeigte sich nun die bemerkenswerte Tatsache, daß in den meisten Fällen trotz — oder man möchte fast sagen, gerade bei ganz hochgradiger Fettleber die Intensität des autolytischen Ferments eine recht beträchtliche war, so bei starker Fettinfiltration 66, 57 Proz., bei mäßigen parenchymatösen Veränderungen 33 Proz. gelösten N vom Gesamt-N. Nur einmal (Fall 14) ging eine starke Fettinfiltration mit geringen Werten des autolytischen Prozesses einher. Von einem Parallelismus der morphologischen Veränderungen und der chemisch-biologischen Verhältnisse kann keine Rede sein. — Daß diese Verhältnisse nicht mit einander Hand in Hand gehen, dafür wurden übrigens schon von anderer Seite Hinweise erbracht. So wurde oben schon angeführt (Kraus l. c.), daß die

*) Von allen Lebern wurden Stückchen zur mikroskopischen Untersuchung in Formol fixiert, in Alkohol gehärtet oder direkt in Alkohol gelegt, in Celloidin eingebettet und die Schnitte mit Alaun-Hämatoxylin gefärbt.

fettige Degeneration der Organe nichts zu tun hat mit der Bildung von Fett im chemischen Sinne. Auch Münzer*), Weintraud**) u. a. konnten bei Parenchymerkrankungen der Leber (von Erwachsenen) in der Regel keinen, wenigstens keinen durch Stoffwechseluntersuchungen erkennbaren erheblichen Funktionsausfall konstatieren. Nur Pfaundler (l. c.) fand, um diesen Gegensatz auch hier zu betonen, eine beträchtliche Herabsetzung des Gehalts an seinem oxydativen Leberferment bei morphologischen Erkrankungen des Parenchyms. Zur Erklärung des Mißverhältnisses zwischen starken anatomischen, parenchymatösen Veränderungen und reichlichem Gehalt an autolytischem Ferment kann vielleicht der Umstand mit herangezogen werden, daß es sich bei meinen Fettlebern in nur ganz unbedeutendem Maße um eigentliche fettige Degeneration handelte, vielmehr, auch bei atrophischen Säuglingen, fast ausschließlich um Fettinfiltration, mit großtropfigem Fett, wobei ja, nach der neueren Auffassung, das restierende Zellparenchym intakt ist.

Zum Schluß noch eine Bemerkung bezüglich der im frischen Präparate, vor der experimentellen Autolyse, gefundenen Werte für die in Lösung gegangenen stickstoffhaltigen Stoffe. Sie entsprechen, mit 3 Ausnahmen, der Dauer des zwischen Tod und Sektion verlaufenen zeitlichen Intervalls, wie aus folgender Tabelle hervorgeht:

Anzahl der zwischen Tod und Sektion verstrichenen Stunden	N der vor der Autolyse in Lösung gegangenen Stoffe in Proz. zum Gesamt-N.
5—6	6—10
7—12	11—12
19—27	13—21
30	24
Ausnahmen	
2.6.6.	18.16.22.

Diese Beobachtung steht in gutem Einklang mit den entsprechenden Befunden an den intrauterin abgestorbenen Föten. Es läßt sich aus den Zahlen die Bestätigung der schon oben geäußerten Annahme ersehen, daß der Vorgang der Autolyse durch den Tod des Individuums keine Unterbrechung erleidet, vielmehr, wenn auch verlangsamt und abgeschwächt, weiter dauert, bis dann die durch die Versuchsanordnung bewirkten günstigen Be-

*) Münzer, Die harnstoffbildende Funktion der Leber. Archiv f. experiment. Pathologie u. Pharmakologie. 1894. 33.

**) Weintraud, Untersuchungen über den Stickstoffumsatz bei Lebercirrhose. Ibidem. 1892. 31.

dingungen (Erwärmung auf Körpertemperatur u. a.) den Prozeß neuerdings wieder in Gang bringen. Ein Parallelismus zwischen der Menge der gelösten stickstoffhaltigen Stoffe vor und nach der experimentellen Autolyse war übrigens nicht erkennbar.

In dem autolytischen Leberferment haben wir ein Beispiel aus einer sicherlich großen Reihe verschiedenartiger, teils in den Gewebssäften, teils in den Zellen lokalisierter fermentativer Agenzien. Auf diese Organfermente, als deren weitere Repräsentanten in der Leber nur Schmiedebergs Histozym oder die verschiedenen Oxydasen genannt seien, legt die Physiologie neuerdings besonderes Gewicht. Die Vorstellung, daß sie mit ihrem synthetisch und analytisch wirkenden Wechselspiel, durch Auf- und Abbau der Molekularkomplexe, durch Bereitung einer adäquaten Zellnahrung einerseits, Überführung der Stoffwechselprodukte in ausscheidbare Formen andererseits, die Funktionen des Stoffwechsels beherrschen, gewinnt zusehends an Boden.

Aber auch die Pathologie greift bereits auf die Wirkung dieser fermentativen Prozesse zur Erklärung gewisser Krankheitszustände zurück. Es leuchtet ein, daß Störungen im harmonischen Zusammenwirken dieser Fermente zu pathologischen Veränderungen im Organismus führen müssen, daß eine Abnahme ihrer Leistung unter Umständen verhängnisvoll werden kann, und daß auch der Bestand an den Trägern der intrazellulären fermentativen Prozesse für die pathologischen, wie für die physiologischen Zustände von grundlegender Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit glaube ich einen Beitrag nach dieser Richtung hin gegeben zu haben, in dem Studium der Beziehungen eines dieser Fermente, des proteolytischen Enzyms der Leber, zu Ernährungsstörungen. Die Bedeutung der Abnahme des autolytischen Ferments resp. seiner Intensität bei der Pädatrophie liegt nicht nur in dem momentanen Fehlen dieses Faktors im Stoffwechsel, sondern auch, und zwar vor allem, in der in manchen Fällen dauernden Unmöglichkeit, einen Ersatz für denselben zu schaffen. Sehen wir doch zuweilen diese fortgeschrittenen Fälle von Atrophie auch nach Überwindung der eigentlichen Intoxikation, auch bei ausreichender und zweckmäßiger Nahrung, schließlich trotz allem noch zum tödlichen Ausgang kommen. Dabei können die Zellen anatomisch normal befunden werden. Es ist, um ein Bild zu gebrauchen, die Werkstätte vorhanden; auch an Material fehlt es nicht; aber den Zellen sind die Werkzeuge zur Verarbeitung des Materials verloren gegangen. So wird der

unabänderliche Verlauf, der unaufhaltsame Tod mancher Fälle von Atrophie verständlich.

Da es zur Zeit nicht möglich ist, die Bedeutung des proteolytischen Fermentes der Leber für den Lebensprozeß in vollem Umfang zu beurteilen, so möchte ich das Hauptgewicht meiner Befunde vor allem darauf legen, daß uns jenes Verhalten einen Rückschluß auf jenes anderer, vielleicht lebenswichtiger Fermente ermöglicht. In diesem Sinne möge die vorliegende Arbeit als ein erster praktischer Versuch angesehen werden, die pathologischen Veränderungen des Fermentbestandes zur Aufklärung von Krankheitsprozessen heranzuziehen.

Zusammenstellung der Resultate.

1. Bei neugeborenen Kaninchen ist die Intensität der Autolyse, gemessen an der Zunahme der nicht koagulablen, stickstoffhaltigen Stoffe, maximal, und auch beim achttägigen Tiere ist sie noch erheblich größer als später, während sie weiterhin sehr rasch abnimmt, so daß schon bei ein- oder zweimonatlichen Tieren kein konstanter Unterschied mehr gegenüber ausgewachsenen und alten Individuen besteht.

2. Ebenso wenig besteht ein Unterschied zwischen Säuglingen vom zweiten Monate ab und älteren Kindern, oder es wird dieser Unterschied durch andere Einflüsse vollkommen verwischt.

3. Am auffallendsten ist der Zusammenhang der Intensität der Autolyse mit dem Verhalten des Körpergewichts. Je hochgradiger die Atrophie, um so geringer die Wirkung der Autolyse.

4. Die niedrigsten Werte der Autolyse finden sich bei Verdauungsstörungen; dann kommen — in aufsteigender Linie — die durch Gastroenteritis komplizierten Krankheiten; höhere Zahlen finden sich bei Respirationskrankheiten, die höchsten bei Fällen wie Herzfehler, Gehirnhautentzündung.

5. Ein Parallelismus zwischen Intensität der Autolyse und morphologischen Veränderungen in der Leber, Fettinfiltration, läßt sich nicht feststellen.

6. Bei intrauterin abgestorbenen menschlichen Früchten gibt die Menge der bereits vor der experimentellen Autolyse in Lösung gegangenen stickstoffhaltigen Stoffe ein gutes Bild der sich intrauterin abspielenden autolytischen Vorgänge.

7. Ebenso entspricht auch — ein Zeichen für die Fortdauer des autolytischen Vorganges über den Tod des Individuums hinaus — die Dauer des nach Stunden zählenden Intervalls zwischen Tod und Sektion des Kindes im allgemeinen der Menge der bereits vor der experimentellen Autolyse in Lösung gegangenen stickstoffhaltigen Substanzen.

Zusammenstellung der klinischen Beobachtungen, der Sektionsbefunde und der Versuchsprotokolle bei den Säuglingen und älteren Kindern.

NB. Die Ziffern in der ersten Rubrik der Versuchsergebnisse bedeuten stets die Menge des Gesamtstickstoffs, in den nächsten die Menge des Stickstoffs der nicht koagulablen Substanzen vor, bezw. nach der Autolyse, immer berechnet auf 1 g Leberbrei.

Die Ordnung der Fälle ist nach der Intensität des autolytischen Prozesses vorgenommen.

Fall 1. H., Lucie. 23 Monate alt. 1 Monat Brustnahrung.

Körpergewicht im 3. Monat 3900
„ 6. „ 4650
„ 20. „ 6100
„ 23. „ 7550 = 68 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Atrophie (oft Enteritis). — Pneumonia migrans (mit stets hohem Fieber).
Tod am 12. Tage.

Sektion, 20 Stunden post mortem: Ausgedehnte Hepatisation beider Lungen. Milztumor. Myodegeneratio cordis.

Leber, mikroskopisch: Fettinfiltration bis zur Centralvene.

Gesamt-N	= 0,02254		
vor der Autolyse	= 0,00476	= 21,1	Proz. vom Gesamt-N
nach 4täg. „	= 0,01302	= 57,8	„ „ „
„ 6 „ „	= 0,01764	= 78,4	„ „ „

Fall 2. B., Elise. 9 Monate alt. Brustkind.

Körpergewicht: 6150 g, 1 Monat vor dem Tode
5600 „ ½ „ „ „ „ = 60 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Meningitis tuberculosa, manifest 10 Tage vor dem Tode.

Sektion, 6 Stunden post mortem: Meningitis tuberc., Miliartuberkulose der Lungen, Bronchialdrüsen, Mesenterialdrüsen, Leber, Milz.

Leber: Spärl. Miliartuberkel, Fettleber (hochgradige Fettinfiltration, geringe eigentliche fettige Degeneration; nur mehr spärliche Partieen normal).

Gesamt-N	= 0,02142		
vor der Autolyse	= 0,00462	= 21,6	Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. „	= 0,01006	= 47,0	„ „ „
„ 5 „ „	= 0,01428	= 66,7	„ „ „

Fall 3. K., Fritz. 3 Monate alt. Brustkind.

Körpergewicht: Zunahme von 2850 g bis 3300 g in 2 Monaten, dann Stillstand bis zum Tode = 58 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Angeborener Herzfehler mit hochgradiger Cyanose. Stauungskatarrhe, namentlich des Darms.

Sektion, 6 Stunden nach dem Tode: Transposition der Gefäße. Myodegeneratio cordis. Hypostatische Pneumonie.

Leber: starke Stauung. Hochgradig ikterisch.

Gesamt-N	= 0,0217	
vor der Autolyse	= 0,0014	= 6,4 Proz. vom Gesamt-N
nach 4täg. „	= 0,0068	= 31,3 „ „ „
„ 6 „ „	= 0,01302	= 60,0 „ „ „

Fall 4. W., Georg. 4 Monate alt. Illegitim. Brust- u. Beinahrung.

Körpergewicht: 3500 g = 64 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Chronische diffuse Bronchitis; akute Bronchopneumonie. Milztumor. Decubitus.

Sektion, 24 Stunden post mortem: Miliartuberkulose fast aller Organe. Käsige und Bronchopneumonie.

Leber: Miliartuberkel. Starke Fettinfiltration. Leukocytose.

Gesamt-N	= 0,02632	
vor der Autolyse	= 0,00546	= 20,7 Proz. vom Gesamt-N
nach 2täg. „	= 0,01260	= 47,9 „ „ „
„ 4 „ „	= 0,01512	= 57,5 „ „ „

Fall 5. E., Margarete. 5 Monate alt. 2 Monate Brustnahrung.

Körpergewicht: 4450 g = 65 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Pertussis in der 3. Woche. 2 Tage lang von dem Tode allgem. Konvulsionen.

Sektion, 6 Stunden post mortem: akute Bronchopneumonie Emphysem. (Keine Gehirnsektion.)

Leber: normal.

Gesamt-N	= 0,03080	
vor der Autolyse	= 0,00490	= 15,9 Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. „	= 0,01176	= 38,1 „ „ „
„ 6 „ „	= 0,01680	= 50,4 „ „ „

Fall 6. D, Karoline. 28 Monate alt. 8 Monate Brustnahrung.

Guter Ernährungszustand vor der Erkrankung, dann zieml. abgemagert — etwa 80 Proz. des normalen Körpergewichts.

Klin. Diagnose: Croupöse Pneumonie. Tod nach 14 Tagen.

Sektion, 25 Stunden post mortem: Hepatisation der ganzen linken Lunge und des rechten Unterlappens.

Leber: normal.

Gesamt-N	= 0,02660	
vor der Autolyse	= 0,00658	= 24,7 Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. „	= 0,01078	= 40,5 „ „ „
„ 5 „ „	= 0,01148	= 43,1 „ „ „

Fall 7. B., Lucie. 23 Monate alt. Brustkind.

Körpergewicht: 7550 im 14. Monat
6980 „ 17. „
jetzt stark abgemagert: 65 Prozent des normalen Gewichts.

Klin. Diagnose: Rachitis. Enteritis chron. Pertussis in d. 3. Woche. Diffuse Bronchitis. Seit 4 Tagen Bronchopneumonie mit sehr hohem Fieber.

Sektion, 12 Stunden post mortem: adhäsive und exsudative rechtsseitige Pleuritis und Pneumonie.

Leber: hart und blutreich. Mikroskopisch sehr gut erhaltene Zellen, Leukocytose.

Gesamt-N	= 0,03108		
vor der Autolyse	= 0,00392	= 12,6	Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. „	= 0,01288	= 41,4	„ „ „
„ 7 „ „	= 0,01134	= 36,4	„ „ „

Fall 8. F., Viktor. 2 Monate alt. Illegitim. Seit 14 Tagen künstliche Ernährung.

Körpergewicht: Nach Zunahme von 2360 g auf 3520, in 4 Tagen Abnahme auf 3000 = 81 Proz. des normalen Gewichts, 1 Tag vor dem Tode.

Klin. Diagnose: Akute Gastroenteritis. (Pyocyaneus im Magensaft). Tetanie. Tod nach 4 Tagen.

Sektion, 9 Stunden post mortem. Hyperämie und follikuläre Schwellung, namentlich im Dickdarm. Starke Hyperämie des Mesenteriums.

Leber: etwas ikterisch. Geringe interstitielle Kernvermehrung.

Gesamt-N	= 0,02968		
vor der Autolyse	= 0,00336	= 11,3	Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. Autolyse	= 0,00966	= 32,5	„ „ „
„ 5 „ „	= 0,00896	= 30,2	„ „ „
„ 7 „ „	= 0,01162	= 39,1	„ „ „

Fall 9. L., Hermine. 4 Monate alt. Seit 2 Monaten künstlich genährt.

Körpergewicht: 3850 g 1 Woche vor dem Tode
3700 g 3 Tage „ „ „ = 65 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Rachitis gravis. Schwerer Pertussis in der 5. Woche. Akute diffuse Bronchitis und Enteritis. Hohes Fieber und Konvulsionen in den letzten 3 Tagen.

Sektion, 2 Stunden nach dem Tode: Totale Pneumonie beider Unterlappen. Anämie der übrigen Organe. (Keine Gehirnsektion.)

Leber: etwas vergrößert.

Gesamt-N	= 0,0273		
vor der Autolyse	= 0,0049	= 17,9	Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. Autolyse	= 0,0087	= 31,8	„ „ „
„ 6 „ „	= 0,0091	= 33,3	„ „ „

Fall 10. K., Emil. 5 Monate alt, illegitim. Flaschenkind.

Körpergewicht: 3400 g im 2. Monat
4000 „ „ 3. „
4270 „ „ 4. „
3500 „ „ 5. „ kurz vor dem Tode = 55 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Pädatrophie (Temperaturen 33—34°), Abscedierende Furunkel. Akute Gastroenteritis vor dem Tode.

Sektion, 7 Stunden nach dem Tode: Myodegeneratio cordis, Schwellung der Peyerschen Placques und der Follikel im Darm.

Leber: braune Atrophie mit Verschmälerung der Zellen, starke Leukocytose.

Gesamt-N = 0,02898
vor der Autolyse = 0,00350 = 12,0 Proz. vom Gesamt-N
nach 4täg. „ = 0,00390 = 13,4 „ „ „
„ 6 „ „ = 0,00952 = 32,8 „ „ „

Fall 11. L., Edmund. 18 Monate alt. Illegitim. Flaschenkind.

Körpergewicht: 4000 g im 4. Monat
5800 „ „ 10. „
6000 „ „ 16. „ = 65 Proz. des normalen Gewichts.

Klin. Diagnose: Rhachitis, Atrophie. Akute Bronchitis und Bronchopneumonie.

Sektion, 19 Stunden post mortem: Beiderseits ausgedehnte Pneumonie.

Leber: anämisch, im übrigen normal.

Gesamt-N = 0,02940
vor der Autolyse = 0,00406 = 13,8 Proz. vom Gesamt-N
nach 4täg. „ = 0,00826 = 28,1 „ „ „
„ 6 „ „ = 0,00952 = 32,4 „ „ „

Fall 12. S., Marie. 7 Monate alt. Flaschenkind.

Körpergewicht: 2750 g im 1. Monat
2400 „ „ 3. „
2600 „ „ 4. „ , dann langsame Abnahme
bis 2100! „ „ 7. „ = 31 Proz. des normalen Gewichts.

Klin. Diagnose: Pädatrophie (zu skelettartiger Abmagerung, nie Durchfälle).

Sektion, 11 Stunden nach dem Tode: Kleine bronchopneumonische Herde. Hochgradige Atrophie aller Organe.

Leber: Geringe Stauung, Zellen nicht atrophisch.

Gesamt-N = 0,04536
vor der Autolyse = 0,00504 = 11,1 Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. „ = 0,00910 = 20,0 „ „ „
„ 6 „ „ = 0,01232 = 27,1 „ „ „
„ 9 „ „ = 0,01148 = 25,3 „ „ „

Fall 13. E., Karoline. 20 Monate alt. $^3/_4$ Jahre Brustnahrung.

Körpergewicht: 7000 g im 15. Monat
6770 „ „ 17. „
5780 „ „ 19. „
5500 „ „ 20. „ , 8 Tage vor dem Tode
5600 g im 20. „ , 2 „ „ „ „
50 Proz. des normalen.

Klin. Diagnose: Atrophie, Rhachitis. Morbilli mit Pneumonie. Recidiv der Pneumonie 14 Tage vor dem Tode.

Sektion, 5 Stunden nach dem Tode: Ausgedehnte Pneumonie beiderseits.

Leber: normal.

Gesamt-N = 0,02856
vor der Autolyse = 0,00280 = 9,7 Proz. vom Gesamt-N
nach 3täg. „ = 0,00553 = 19,3 „ „ „
„ 5 „ „ = 0,00658 = 23,0 „ „ „

Fall 14. V., Emilie. 7 Monate alt. Flaschenkind.

Körpergewicht: 4080 g im 2. Monat
4000 „ „ 3. „
4420 „ „ 4. „
4900 „ „ 5. „
4320 „ „ 7. „ , kurz vor dem Tode.

Klin. Diagnose: Enteritis chronica, Hydrocephaloid. Konvulsionen u. Fieber in den letzten Tagen.

Sektion, 6 Stunden nach dem Tode: frische bronchopneumonische Herde. Anämie der Organe. Darmschleimhaut sehr glatt.

Leber: starke Fettinfiltration mit Stauung namentlich im Centrum der Acini.

Gesamt-N	= 0,02464		
vor der Autolyse	= 0,00154	= 6,2	Proz. vom Gesamt-N
nach 4täg. „	= 0,00294	= 11,9	„ „ „
„ 7 „ „	= 0,00462	= 18,8	„ „ „

VIII.

Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe*).

Von **Ivar Bang.**

(Aus dem physiol.-chemischen Laboratorium zu Lund, Schweden.)

Erste Mitteilung.

Als ich vor zwei Jahren in diesen Beiträgen eine vorläufige Mitteilung über das Nucleohiston veröffentlichte, geschah es in der Hoffnung, daß eine ausführliche Publikation nach kurzer Zeit folgen könnte. Zum Teil sind es äußere Gründe, die Schuld tragen an der eingetretenen Verzögerung, zum Teil aber war sie bedingt durch die Notwendigkeit, die Untersuchung weiter, als ursprünglich beabsichtigt, auszudehnen.

So hat sich inbetreff der Nucleoproteide der Thymus eine ganze Reihe neuer Fragen ergeben. Weiter habe ich es für wünschenswert erachtet, auch andere lymphatische Organe in den Kreis der Untersuchungen einzubeziehen.

Beinahe alle Arbeiten dieses Gebietes sind nämlich mit der Absicht unternommen, die Frage der Koagulation des Blutes aufzuklären — ich verweise z. B. auf die Arbeiten von Lilienfeld und Huiskamp —, und die an der Thymus gewonnenen Resultate sind ohne weiteres oder doch ohne zureichende Begründung auf Lymphdrüsen und Leucocyten übertragen worden.

Einer solchen Auffassung konnte ich mich nicht anschließen, und so blieb mir nichts übrig als auch diese Organe einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen.

Die vorliegende Arbeit zerfällt darnach in drei verschiedene Abschnitte, wovon der erste die Nucleoproteide der Thymus und deren nähere Spaltungsprodukte umfaßt, während der zweite und

---

*) Eine unvollständige norwegische Publikation erschien in Archiv f. Mathematik og Naturvidenskab 1902.

dritte sich auf die Nucleoproteide der Lymphdrüsen und Leucocyten nebst Knochenmark und Milz bezieht.

Hieran soll sich als vierter Abschnitt eine chemische Untersuchung der Rundzellen-Sarkome anschließen.

Erster Abschnitt.

Die Nucleoproteide der Thymus und deren Zusammensetzung.

Bekanntlich haben die Untersuchungen von Huiskamp, Malengreau und mir erwiesen, daß Lilienfelds Nucleohiston kein einheitlicher Körper ist, sondern aus zwei verschiedenen Nucleoproteiden besteht. Huiskamp bezeichnet das eine davon als das wahre Nucleohiston im Sinne Lilienfelds; das andere enthält ihm zufolge kein Histon, geht aber in das nach Lilienfeld dargestellte Nucleohiston als Verunreinigung ein. Mit Huiskamp habe ich gefunden, daß das Nucleoproteid kein Histon enthält, dagegen habe ich für das Nucleohiston eine von Lilienfelds und Huiskamps Angaben abweichende Zusammensetzung gefunden. Nach Lilienfelds Schema besteht das Nucleohiston aus Histon und Leuconuclein, welches sich weiter in Eiweiß und Nucleinsäure zerlegen läßt. Die Existenz des Leuconucleins wurde von mir bestritten; diese Verbindung besteht meiner Meinung nach aus Nucleinsäure und Histon in salzartiger Bindung. Malengreau stimmt laut seiner letzten Arbeit in dieser Beziehung mit mir überein. Dagegen vertritt er betreffs des ersten Nucleoproteids eine andere Auffassung als Huiskamp und ich, indem er in diesem das eigentliche Nucleohiston gefunden zu haben meint.

Nach Huiskamp enthält also die Thymus Nucleoproteid (frei von Histon) und Nucleohiston, nach Malengreau Nucleohiston und nucleinsaures Histon und nach meiner Ansicht Nucleoproteid und nucleinsaures Histon.

Die von den verschiedenen Untersuchern dargestellten Substanzen können nach dem Gesagten kaum identisch sein, jedenfalls nicht Malengreaus und Huiskamps Proteide. Dementsprechend zeigen auch die betreffenden Elementaranalysen ganz erhebliche Differenzen. Huiskamps Nucleoproteide enthalten 0,97 Proz. P und 3,7 Proz. P, während jene Malengreaus einen Phosphorgehalt von 0,5 Proz. und 4,5 Proz. aufweisen.

Aus diesen Differenzen geht hervor, daß entweder die Thymusdrüse eine ganze Anzahl verschiedener Nuclein-Körper enthält, oder daß die Nucleoproteide bei den verschiedenen Darstellungsverfahren wesentlich verändert werden, oder endlich daß man je nach der Darstellungsmethode mehr oder weniger reine bezw.

verunreinigte Körper erhält. — Nur durch die vergleichende Untersuchung der betreffenden Körper war hierüber zu einem begründeten Urteil zu gelangen.

Eine solche Untersuchung mußte sich beziehen: 1. auf das Nucleoproteid von Huiskamp und mir, sowie auf das Nucleohiston (A-Nucleoalbumin) von Malengreau und 2. auf das Nucleohiston von Huiskamp und das nucleinsaure Histon von mir und Malengreau (von M. auch B-Nucleoalbumin genannt).

1. Untersuchung des Nucleoproteids.

Nach Lilienfeld kann man durch Extraktion von Thymus mit 10-proz. Kochsalz-Lösung eine Flüssigkeit erhalten, aus der auf Zusatz von Wasser das wasserunlösliche Nucleoproteid ausfällt. Bei Nachprüfung dieser Angabe Lilienfelds kam ich zu der Überzeugung, daß das Nucleoproteid ein Kunstprodukt ist und habe deswegen von dieser Methode Abstand genommen.

Huiskamp stellte sein Nucleoproteid nach Ausfällung des Nucleohistons mit Chlorcalcium dar, indem er das Filtrat mit verdünnter Essigsäure fällte. Auch Malengreau ging von dem Wasserextrakte aus; er erhielt seine Nucleoproteide durch fraktionierte Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung.

Endlich habe ich mein Nucleoproteid in der Weise dargestellt, daß ich die Thymusdrüsen mit 0.9 Proz. Kochsalzlösung auszog und das Extrakt mit Essigsäure fällte.

Den qualitativen Reaktionen nach konnte man a priori vermuten, daß Huiskamps und mein Nucleoproteid jedenfalls einander sehr nahe verwandt sind. Aber erst der Vergleich der elementaren Zusammensetzung konnte die Identitätsfrage entscheiden.

Da ich früher keine Elementaranalyse von meinem Nucleoproteide ausgeführt habe, war dies meine nächste Aufgabe.

Zur Darstellung der analysierten Präparate wurden ganz frische Thymusdrüsen in der Fleischhackmaschine zerkleinert, mit 1½—2 l 0.9-proz. Kochsalzlösung versetzt und damit 24—48 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Wenn nötig, setzte ich einige Tropfen Chloroform hinzu.

Nach dieser Zeit hatte die Flüssigkeit ein milchähnliches Aussehen angenommen, welches sich bei dem nachfolgenden Zentrifugieren und Filtrieren nicht änderte. Die Drüsenmasse blieb anscheinend die ganze Zeit unverändert. Die Reaktion der Lösung war deutlich amphoter, und doch trat die alkalische Komponente stärker hervor.

Wenn ich nun zu der zentrifugierten und filtrierten Flüssigkeit Chlorcalcium hinzufügte, kam es niemals zu einer Fällung, wie viel oder wenig ich auch zusetzen mochte, was insofern bemerkenswert ist als Huiskamp für sein Nucleoproteid das Entgegengesetzte gefunden

hat, obwohl auch sein Proteid viel schwieriger und erst nach größerem Zusatze von Chlorcalcium niedergeschlagen wurde, als das Nucleohiston.

Auch nach der Dialyse verhielt sich die Flüssigkeit gegen Chlorcalcium indifferent, und somit kann nicht die Gegenwart von Kochsalz diesen Unterschied erklären. Dagegen gab Kalkwasser eine ausgiebige Fällung, und ebenso verhielt sich Chlorcalcium, wenn man vorher Alkali bis zu schwach alkalischer Reaktion zugesetzt hatte. Vielleicht hat Huiskamp erst sein Proteid mit Essigsäure niedergeschlagen und in Alkali wieder gelöst, als er es mit Chlorcalcium fällte. Übrigens vermochte ich auch im Wasserextrakte nach Ausfällung des Nucleohistons mit Chlorcalcium bei weiterem Zusatz von Chlorcalcium keinen Niederschlag zu erhalten.

Hingegen gab Essigsäure eine ausgiebige Fällung. Das gefällte Nucleoproteid war aber sehr leicht im Überschuß von Säuren — auch Essigsäure — löslich. 1 Proz. Essigsäure und 0,2 Proz. HCl genügten zur vollständigen Lösung des Niederschlages. Dieselbe Beobachtung teilt auch Malengreau für sein A-Nucleoalbumin mit.

Die Essigsäure-Fällung war gelblich-weiß. Nach mehrmaligem Auswaschen mit Wasser und Behandlung mit Alkohol-Äther resultierte ein feines, gelbweißes Pulver, welches, bei 100° C getrocknet, folgende Werte gab:

C 49,50 Proz., H 6,35 Proz., N 16,51 Proz., P 1,22—1,01 Proz.

Die Substanz enthielt 2,36 Proz. Asche und Schwefel, auch bleischwärzenden, dessen Menge nicht bestimmt wurde.

Vergleicht man diese analytischen Ergebnisse mit den Zahlen, welche Huiskamp im Mittel für sein mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid erhielt, so findet man eine ziemlich gute Übereinstimmung, namentlich im Phosphorgehalt:

	C	H	N	P	Asche
Huiskamp	50,09 Proz.	7,18 Proz.	16,11 Proz.	0,97 Proz.	3,11 Proz.
Bang	49,50 „	6,35 „	16,51 „	1,12 „	2,36 „

Den ohnehin nicht großen Differenzen bei den übrigen Elementen ist wohl keine Bedeutung beizumessen, zumal man auf C- und H-Bestimmungen kein zu großes Gewicht legen darf, wenn es sich um Eiweißkörper handelt.

Ich habe ferner ein Präparat nach Huiskamps Methode dargestellt. Die Analysen ergaben 0,91 Proz. P und 15,89 Proz. N. Der Aschegehalt war 2,18 Proz.

Aus den Analysen geht hervor, daß Huiskamps und mein Proteid, abgesehen von unwesentlichen Verunreinigungen identisch sind. Ich will auch gleich bemerken, daß ich bei der Untersuchung der Spaltungsprodukte eine vollständige Übereinstimmung unserer Nucleoproteide gefunden habe.

Im Anschluß hieran sei erwähnt, daß ein Präparat, welches mehrere Male mit Alkohol ausgekocht worden war, 1,42 Proz. P enthielt. Es läßt sich somit der Phosphor nicht aus dem Nucleoproteid mit Alkohol ausziehen wie aus dem Proteide der Magenschleimhaut.

Malengreau schlägt seine beiden Nucleoproteide aus dem Wasserextrakte der Thymus mit Essigsäure nieder. Der Niederschlag wird mit sehr verdünntem Alkali gelöst und die Lösung mit gesättigter Ammonsulfatlösung fraktioniert. Die Halbsättigungs-Fraktion, welche das A-Nucleoalbumin enthält, wird in viel Wasser gelöst und mit Essigsäure gefällt. Malengreau bemerkt, daß das A-Nucleoalbumin in 0,9 Proz. Kochsalzlösung sowie in 0,1 Proz. Chlorcalciumlösung löslich ist, was zu meinem Nucleoproteid stimmt. Mit Huiskamp finde ich, daß die durch Halbsättigung erhaltene Fällung sich nicht vollständig in Wasser löst; ein nicht geringer Rest bleibt ungelöst zurück. —

Bei der Untersuchung des nach Malengreaus Methode dargestellten A-Nucleoalbumins erlaubte ich mir, in einer Beziehung von seiner Vorschrift abzuweichen: ich unterließ die vorhergehende Fällung mit Essigsäure und fraktionierte die Wasserextrakte direkt.

Das Wasserextrakt aus 500 g Thymus hatte dasselbe opaleszierende Aussehen wie das Kochsalzextrakt. Halbsättigung mit Ammonsulfat ergab eine reichliche Fällung, welche sich nicht vollständig im Wasser löste. Die Lösung wurde noch einmal mit Ammonsulfat gefällt und der Niederschlag mit essigsäurehaltigem Wasser ausgewaschen. Weiter versetzte ich den Niederschlag mit 200 ccm 0,3-proz. Salzsäure, welche etwas löste. (Malengreau hat gezeigt, daß das Nucleoproteid, wenn einmal ausgefällt, sich nur teilweise in 0,3-proz. HCl löst.) Nach 24 Stunden wurde filtriert. Das Filtrat gab mit Ammoniak im Überschuß versetzt keinen Niederschlag. Wenn ich aber das Filtrat 24 Stunden dialysierte und jetzt eine Probe mit einem Tropfen Ammoniak versetzte, bildete sich ein voluminöser Niederschlag und man konnte weiter nach und nach sehr viel Ammoniak zusetzen, ohne daß der Niederschlag sich wieder löste. Wenn man aber auf einmal einen Überschuß von Ammoniak zufügte, fiel absolut kein Niederschlag aus; doch konnte ich auch in diesem Falle einen solchen hervorrufen, wenn ich etwas Ammoniumsulfat zusetzte.

Malengreaus Nucleoproteid wurde somit bei der Einwirkung von 0,3 Proz. Salzsäure in eine lösliche Komponente und einen unlöslichen Rest gespalten.

So weit stimme ich mit Malengreau überein, dagegen ist noch zu beweisen, daß die in Salzsäure lösliche Komponente ein Histon ist. Gegen eine solche Annahme spricht entschieden die Beobachtung, daß der Niederschlag durch Ammoniak schon bei neutraler, ja auch äußerst schwach saurer Reaktion zustande kommt. Bei fortgesetzter Dialyse der sauren Lösung kommt auch in diesem Falle der Niederschlag zum Vorschein. So verhält sich aber kein Histon. —

Ich untersuchte nun mein Nucleoproteid nach derselben Methode.

Zuerst versuchte ich, die Fällungsgrenzen gegen Ammonsulfat im Kochsalzextrakte aus Thymus zu bestimmen. Doch war es hier unmöglich, die untere Fällungsgrenze scharf festzustellen, da die Lösung von Anfang an opaleszierte. Wirkliche Fällung trat gewöhnlich ungefähr bei 30, in manchen Fällen schon bei 20, in anderen bei 25 Proz. Sättigung ein. Die obere Fällungsgrenze der ersten Fraktion lag etwa bei 35—40, die zweite Fraktion begann bei 46 zu fallen und war bei 60 Proz. ausgefällt. Eine dritte und letzte Fraktion lag zwischen 60 Proz. und gänzlicher Sättigung. Die erste Fraktion war in Wasser unvollständig löslich, die andere vollständiger. Die Lösungen sämtlicher Fraktionen gaben mit Essigsäure Niederschläge. Es zeigte sich aber bei mehrmaliger Reinigung, daß die zweite Fraktion aus einem Gemenge der Substanzen der ersten und dritten Fraktion bestand.

Danach enthält somit das Kochsalzextrakt (abgesehen von Globulin) zwei durch Essigsäure fällbare Substanzen, die eine bildet die leichter fällbare Fraktion und ist in bei weitem überwiegender Menge vorhanden, die andere findet sich in der zweiten (ursprünglich dritten) nur ganz unbedeutenden Fraktion. In ganz derselben Weise verhielt sich das Wasserextrakt nach Ausfällung des Nucleohistons mit Chlorcalcium.

Es hatte sich somit eine gute Übereinstimmung der Fällungsgrenzen der Nucleoproteide von Huiskamp, Malengreau und mir ergeben. Die nächste Aufgabe war die Untersuchung der Substanz, welche sich durch Salzsäure-Behandlung extrahieren läßt.

Da die 0,3-proz. Salzsäure direkt zur Kochsalzlösung gesetzt überhaupt keine Fällung erzeugt, mußte man sie auf die Essigsäure-Fällung des Nucleoproteids einwirken lassen. Hier ist es aber nötig, auf beide von Essigsäure fällbare Substanzen Rücksicht zu nehmen. Deswegen löste ich die Essigsäure-Fällung in sehr verdünntem Alkali. Diese Lösung war aber eine ziemlich unvollständige, trotzdem die Fällung gründlich ausgewaschen und sehr fein verteilt war; ich mußte Alkali bis zu 0,3 Proz. zusetzen, und doch erfolgte die Lösung sehr langsam. Nach erfolgter Lösung wurde dialysiert, wobei sich wieder eine milchähnliche Beschaffenheit einstellte, und nun erst konnte ich zur Fraktionierung schreiten.

Zu meiner Überraschung fand ich jetzt ganz abweichende Fällungsgrenzen. Die untere Grenze lag nämlich schon bei 12—15, und die Ausfällung der ersten Fraktion war bei 18—20 vollendet. Diese Fraktion enthielt eine reichliche Menge Substanz, und im Filtrate brachte nach der Dialyse verdünnte Essigsäure nur eine ganz spärliche Fällung hervor. Dieser Niederschlag, in verdünntem Alkali gelöst, wurde teilweise bei 20 Proz. Sättigung mit Ammonsulfat gefällt. Der Rest wurde erst durch Sättigung mit Salz

niedergeschlagen. (In einigen Fällen kam keine weitere Fällung bei Zusatz von 20 Proz. zu stande, sondern erst bei Sättigung mit Ammonsulfat.)

Dieses eigentümliche Verhalten habe ich nun sehr eingehend studiert und gefunden, daß die obere Fällungsgrenze für die Hauptmenge der Substanz bei 17—18 liegt. Die Konzentration der Lösung übt hierauf nur einen sehr geringen Einfluß aus. — In mehreren Kochsalzextrakten bestimmte ich die Fällungsgrenzen vor und nach der Fällung mit Essigsäure. Ohne Ausnahme wurde dieselbe Verrückung der Fällungsgrenzen konstatiert: Im ursprünglichen Kochsalzextrakt lag gewöhnlich die untere Fraktionsgrenze bei 30 oder schon bei 20; aber diese Fällung war nur äußerst gering und trat erst nach 24 Stunden auf, während die Essigsäure-Fällung in Alkali gelöst augenblicklich eine quantitative Fällung bei 17—18 ergab. Und dieser Niederschlag, mit einer Spur von Alkali gelöst, wurde wieder vollständig bei 20 Proz. Sättigung ausgefällt.

Noch beweisender scheint mir folgender Versuch: In einem Kochsalzextrakte wurde die untere Fraktionsgrenze zu 25 bestimmt. Dieser Flüssigkeit wurden 10 Teile der Essigsäure-Fällung, in Alkali gelöst und darauf dialysiert, zugesetzt, und jetzt gab 20 eine ausgiebige Fällung; im Filtrate waren die ursprünglichen Fraktionsgrenzen unverändert.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Nucleoproteid bei der Behandlung mit Essigsäure oder Alkali eine Veränderung erleidet.

Um zu erfahren, welches von den Reagentien — die Essigsäure oder das Alkali — die Veränderung bewirkt, setzte ich zu Proben des Kochsalzextraktes verschiedene Mengen Alkali und nachher Ammonsulfat bis zu 20 Proz. Sättigung. Es zeigte sich hierbei, daß ein Zusatz von 0,01 Proz. NaOH keine Veränderung bewirkte, 0,02 Proz. NaOH bewirkte eine unvollständige Fällung durch Ammonsulfat und 0,03 Proz. einen reichlichen Niederschlag, welcher sich nicht bei einem weiteren Zusatz von Alkali vermehrte. In den Kontrollversuchen setzte ich zuerst zu den Proben Ammonsulfatlösung und nachher Alkali. In keinem von diesen entstand Fällung, selbst wenn man Alkali bis 1 Proz. zufügte. Dies Verhalten konnte selbstverständlich nur dadurch verursacht sein, daß sich die Natronlauge mit Ammonsulfat umsetzt, und folglich durfte in diesem Falle ein Zusatz von Ammoniak und dann von Ammonsulfat keinen Niederschlag ergeben — was auch in der Tat der Fall war. Dadurch daß der

Natronzusatz eine solche Veränderung der Fällungsgrenzen bewirken kann, ist nicht ausgeschlossen, daß auch die Essigsäure eine ähnliche Wirkung hat. In der Tat konnte ich dies leicht nachweisen, indem ich die Essigsäure-Fällung in sehr verdünntem Ammoniak auflöste und die Lösung mit Ammonsulfat fraktionierte. Nach den eben angeführten Versuchen hat nämlich ein Zusatz von Ammoniak nicht die Verrückung der Fällungsgrenzen zur Folge. Noch beweisender ist jedoch die folgende Beobachtung. Nach mehrmaliger Behandlung der Essigsäure-Fällung mit destilliertem Wasser geht nach und nach ein Teil wieder in Lösung, und dieser wird ebenfalls von 20 Proz. Ammonsulfat niedergeschlagen.

Welche ist nun die Veränderung, die hier stattgefunden hat?

Zur Beantwortung dieser Frage stellte ich aus der Fraktion mit den Fällungsgrenzen 12—18 ein Präparat zur Analyse dar. Dies enthielt 1,00 Proz. bezw. 1,03 Proz., im Mittel 1,02 Proz. P, besaß also denselben Phosphor-Gehalt wie die Essigsäure-Fällung selbst. Man könnte somit annehmen, daß keine wesentliche Veränderung eingetreten war. Und doch war dies der Fall.

Ich habe schon bemerkt, daß der Essigsäure-Niederschlag ziemlich schwer in verdünntem Alkali löslich war, und in Ammoniak erfolgte die Lösung noch viel langsamer. Eine genauere Untersuchung der Löslichkeitsverhältnisse lehrte, daß ein Teil des Niederschlages anscheinend leichter löslich war als ein anderer. Deswegen extrahierte ich in einem Versuch den Niederschlag mit 0,04 Proz. NaOH, welche nur einen Teil davon löste, und schlug im Filtrate das Proteid mit Essigsäure nieder. Der Phosphorgehalt des so erhaltenen Präparates, das 16.57 Proz. N enthielt, war 2,10 und 2,38 Proz., im Mittel 2,24 Proz. P, also zweimal so hoch als jener des ursprünglichen Nucleoproteids.

Dieses Verhältnis zeigt, daß das Nucleoproteid schon bei der Behandlung mit verdünnter Essigsäure in zwei Komponenten zerlegt wird, wovon die eine sehr leicht, die andere ziemlich schwer in verdünntem Alkali löslich ist. Essigsäure ist somit kein indifferentes Reagens zur Ausfällung dieses Nucleoproteids, eine Beobachtung, welche überhaupt zur Vorsicht bei Benutzung dieses Reagens zur Darstellung der Nucleoproteide mahnt.

Kehren wir wieder zu der Untersuchung der Einwirkung von Salzsäure auf das Nucleoproteid zurück. Wie schon bemerkt, bewirkt 0,3 Proz. HCl keinen Niederschlag im Kochsalzextrakt und, wie ich zufügen kann, auch nicht in einer Lösung des Essigsäure-

Niederschlages. Läßt man aber 0,3 Proz. HCl auf den Essigsäure-Niederschlag selbst einwirken, so findet zwar keine vollständige Lösung statt, es gehen aber reichliche Mengen Substanz in die Salzsäure über.

In meiner ersten Mitteilung über das Nucleoproteid habe ich ebenso wenig wie später Huiskamp eine Spaltung bei derartiger Salzsäurebehandlung gesehen. Ich nehme hier ausdrücklich von dieser Angabe Abstand. Ich habe auch bei der Untersuchung des nach Huiskamps Methode dargestellten Nucleoproteids dieselbe Spaltung eintreten sehen, und schließe mich in diesem Punkte vollständig Malengreau an.

Eine Erklärung der abweichenden Befunde von Huiskamp und mir kann ich nicht geben. Zwar ist mir einmal bei diesen Untersuchungen vorgekommen, daß die Salzsäureextraktion negativ ausfiel, aber mindestens 20 Mal habe ich ein positives Resultat erhalten. Malengreau bemerkt (La Cellule, Tome XIX, pg. 293), daß ihm dasselbe vorkam, wenn er seine Substanzen mit Ammonsulfat ausfällte. Ich habe speziell untersucht, ob vielleicht das proteolytische Ferment der Thymus hier eine Rolle spielt, und habe deshalb die Kochsalzextraktion bei 0° vorgenommen, ohne jedoch einen Unterschied zu finden.

Versetzt man das filtrierte Salzsäureextrakt vorsichtig mit Ammoniak, so entsteht ein reichlicher Niederschlag, welcher ausbleibt, wenn man rasch einen Überschuß von Ammoniak hinzufügt. Es ist weiter nicht notwendig, Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion zuzusetzen, schon bei neutraler, ja selbst schwach saurer Reaktion tritt der Niederschlag ein, und im Filtrate kann man keine Spur von Eiweiß nachweisen.

Hiermit ist bewiesen, daß mein (und Huiskamps) Nucleoproteid bei der Einwirkung von 0,3 Proz. HCl dasselbe Spaltungsprodukt wie Malengreaus liefert, und daß dies Spaltungsprodukt kein Histon ist.

Die Histone verbinden sich nämlich ohne Ausnahme mit Säuren zu löslichen Salzen von neutraler Reaktion, und eine Substanz, die schon bei saurer Reaktion ausgefällt werden kann, ist überhaupt kein Histon.

Dagegen stimmen die Reaktionen des Spaltungsproduktes vollkommen mit jenen eines Acidalbuminates überein, und ich möchte es auch ohne Bedenken als Acidalbuminat bezeichnen.

Schon in meiner Histonarbeit habe ich nachgewiesen, daß Albuminate von Ammoniak niedergeschlagen werden können, wenn man es vorsichtig zusetzt und dasselbe ist auch hier der Fall. Ich benutze die Gelegenheit, um hier nochmals hervorzuheben, daß man zum Nachweis des Histons sich nicht an der Ammoniakreaktion genügen lassen darf, und ich werde noch in dieser Abhandlung Gelegenheit finden, zu zeigen, welche verhängnisvollen Mißverständnisse die unkritische Benutzung dieser Reaktion veranlassen kann. —

Ich habe weiter das Verhalten des Albuminates zu Ammonsulfatlösung untersucht. Sowohl in saurer als in ganz schwach alkalischer Lösung wird das Albuminat vollständig bei 20 Proz. Ammonsulfatsättigung niedergeschlagen*). Wenn ich oben erwähnt habe, daß ein Zusatz von Ammonsulfat zur ammoniakalischen Lösung des Albuminates dieses aufs neue niederschlägt, so ist das als eine Aussalzung zu betrachten. Das Albuminat enthält keinen Phosphor. Der Stickstoff-Gehalt betrug 16,59 Proz.

Der nach der Salzsäureextraktion ungelöst gebliebene Rest war in verdünntem Alkali leicht löslich und konnte hieraus wieder mit Essigsäure niedergeschlagen werden. In einem Minimum von Alkali gelöst wurde die Substanz bei 20 Proz. Ammonsulfatsättigung gefällt.

Die Eiweißreaktionen waren positiv. Nach Digestion mit Magensaft resultierte ein Nuclein, welches sowohl Phosphor als Purinbasen enthielt. Dasselbe Nuclein entsteht, wenn man das Nucleoproteid selbst digeriert, d. h., wenn man den Magensaft auf die Essigsäurefällung des Nucleoproteids einwirken läßt. Dagegen entsteht kein Nuclein, wenn das Nucleoproteid zuerst in der Salzsäure gelöst wird. —

Die Natur der Purinbasen habe ich nicht untersucht. Auch gelang es nicht, die Nucleinsäure zu isolieren. Nach Schmiedebergs Kupfer-Kali-Methode läßt sich die Nucleinsäure nicht darstellen. — Eine Pentosengruppe existiert hier nicht.

Behufs Analyse wurde der in Salzsäure unlösliche Rest des Nucleoproteids in Alkali gelöst, wieder mit Essigsäure ausgefällt, ausgewaschen und mit Alkoholäther behandelt. Die Analyse ergab einen P-Gehalt von 2,49 Proz. und 2,69 Proz. P. — durchschnittlich 2,59 Proz. P. — und 16,58 Proz. N. Die Substanz ist folglich selbst als ein Nuclein anzusehen.

Vergleicht man diese Werte mit jenen des 0,04-proz. Alkaliextraktes der Essigsäurefällung, so zeigt sich deutliche Übereinstimmung. Hier wurde 2,59 Proz. P gefunden, dort 2,24 Proz. Der Rest ist nämlich in verdünntem Alkali leicht löslich im Gegensatz zu dem Albuminat. Wenn man daher die Essigsäurefällung des Nucleoproteides mit sehr verdünntem Alkali extrahiert, geht wesentlich das Nuclein in Lösung, und das Albuminat bleibt zurück. Doch gehen kleine Mengen davon ebenfalls in Lösung, — was auch die Phosphorbestimmungen zeigen. Dementsprechend kann man auch durch Extraktion mit Salzsäure die Existenz des Albuminates nachweisen. —

Die Untersuchung der Spaltungsprodukte gibt uns auch eine Erklärung der Veränderungen, welche die Einwirkung von Essig-

*) Ebenso verhält sich aus Albumin dargestelltes Acidalbuminat.

säure und Alkali hervorruft. Das Nucleoproteid wird von diesen Reagentien ebenso wie von Salzsäure gespalten, und die Verrückung der Fällungsgrenzen zeigt dabei die Bildung von Nuclein und Albuminat an.

Es kann nun auch nicht befremden, daß der Niederschlag mit 20-proz. Ammonsulfat dieselben Werte, wie die Essigsäure-Fällung selbst gibt, da dadurch sowohl das Nuclein als das Albuminat niedergeschlagen wird.

Aus den vorliegenden Versuchen über das Nucleoproteid ist zu entnehmen, daß wir es bei diesem Körper mit einer sehr labilen Substanz zu tun haben, welche äußerst leicht in Nuclein und Albuminat zerfällt. Es erinnert etwas an das Pankreas-Nucleoproteid Hammarstens und das Nucleohiston Lilienfelds. Es scheint, daß die Neutralsalze, z. B. Kochsalz, das Nucleoproteid nicht in seine Komponenten zerlegen können (vgl. auch Malengreau).

Aus den Phosphorbestimmungen kann man ungefähr berechnen, wieviel Nuclein und Albuminat in das Molekül des Nucleoproteids eingehen. Wenn das Proteid etwa 1 Proz. Phosphor enthält, das Nuclein etwa 2,5 Proz. und das Albuminat keinen, so besteht das Nucleoproteid aus etwa 40 Proz. Nuclein und 60 Proz. Albuminat. Der Stickstoff verteilt sich ganz gleichmäßig auf die beiden Komponenten.

Es bleibt endlich noch eine Frage zu beantworten. Den Spaltungsversuchen nach darf man die Nucleoproteide der drei Untersucher für identisch erklären, nicht aber, wenn man die Phosphor-Bestimmungen betrachtet. Malengreau hat für sein Proteid nur 0,5 Proz. P gefunden — Huiskamp und ich 1 Proz. Diese Differenz erklärt sich aber daraus, daß das Wasserextrakt eine große Menge sehr fein suspendierter Verunreinigungen, Zelldetritus u. s. w. enthält, Verunreinigungen, die nicht durch Zentrifugieren und nicht durch Filtration fortgeschafft werden können. Diese haften aber den Niederschlägen an. Deswegen ist das Filtrat nach Halbsättigung mit Ammonsulfat ganz wasserklar im Gegensatz zu der ursprünglichen, opaken Lösung. Andererseits, wenn Huiskamp sein Nucleohiston mit Chlorcalcium fällt, gehen die Verunreinigungen in dieses über. Daher findet Huiskamp nur 3,7 Proz. P im Nucleohiston, während Malengreau 4,5 Proz. P gefunden hat. — Die Verunreinigungen werden eben vom ersten Niederschlage mitgerissen, gleichgültig, ob dieser Nucleoproteid oder Nucleohiston ist.

2. Untersuchung des sogenannten Nucleohistons.

Von den beiden Nucleoproteiden der Thymusdrüse hat unbedingt das „Nucleohiston" die größere Wichtigkeit, sowohl in Anbetracht seiner chemischen Natur als seiner biologischen Bedeutung.

Was das erstere Moment betrifft, so gehen die Ansichten der einzelnen Untersucher, wie eingangs bemerkt, sehr auseinander.

Was die biologische Bedeutung anlangt, will ich nur daran erinnern, daß mehrere Beobachter, z. B. Huiskamp, im Nucleohiston das Fibrinferment vor sich zu haben glaubten. Das Nucleohiston verdient somit eine Bearbeitung. Huiskamp hat ihm auch eine eingehende Untersuchung gewidmet, von Lilienfelds ursprünglichen Arbeiten ganz abgesehen.

Wenn ich in zwei Mitteilungen eine von der herrschenden Vorstellung ganz abweichende Auffassung der Natur des Nucleohistons verfochten habe, so will ich gern zugeben, daß meine Angaben insofern weniger beweisend waren, als sie nur einen vorläufigen Charakter trugen. Das von mir dargestellte nucleinsaure Histon ist in der Tat noch sehr unvollständig studiert, so fehlt z. B. die Analyse, und wir haben keine Anhaltspunkte für seine rationelle Zusammensetzung. Zwar habe ich gezeigt, daß es sich um die Verbindung einer Nucleinsäure mit Histon handelt, diese beiden aber nur qualitativ nachgewiesen.

Darstellung.

Nach meinem Verfahren werden die Thymusdrüsen zuerst mit 0,9-proz. Kochsalzlösung extrahiert, dann folgt die Extraktion mit destilliertem Wasser. Übrigens ist die vorgängige Kochsalzextraktion für die Darstellung der Substanz ganz gleichgültig, und ich habe sie auch öfter unterlassen und die Drüsen mit destilliertem Wasser direkt behandelt. In beiden Fällen beobachtet man unmittelbar nach dem Zusatz des Wassers eine starke Quellung der Drüsenmasse, die sich zu schleimigen halb durchsichtigen Klumpen zusammenballt. Nach 24 Stunden bemerkt man, daß die Stücke zerfallen, während die Flüssigkeit bläulich opalesziert; nach 48 Stunden ist die Lösung ganz undurchsichtig und von milchähnlichem Aussehen, und zur selben Zeit ist ein großer Teil der Thymusdrüse in Lösung gegangen. Auf dem Boden des Gefäßes liegen reichlich grobflockige Reste, welche aus Bindegewebe, Zelldetritus, noch nicht gelösten und unlöslichen Gewebsresten bestehen. Weder Lösung noch Rückstand sind jetzt schleimig. Die Reaktion ist deutlich amphoter.

Gewöhnlich nahm ich 500—1000 g Thymus in Arbeit und zog diese zwei- bis dreimal mit $1^1/_2$—2 l destilliertem Wasser aus. Weiteres Extrahieren ist nicht lohnend. —

Behandelte ich die Thymus direkt mit Wasser ohne vorhergehende Kochsalzextraktion, so war das erste Extrakt reich sowohl an Nucleoproteid als an nucleinsaurem Histon, während das zweite nur wenig Nucleoproteid enthielt. Das dritte und vierte Extrakt war weniger opaleszierend

als die vorhergehenden, sie enthielten nur Spuren von Nucleoproteid und verhältnismäßig mehr nucleinsaures Histon. Das fünfte und das sechste Extrakt waren nur wenig opaleszierend und enthielten nur kleine Mengen von nucleinsaurem Histon, welches aber ziemlich rein war — ein Beweis dafür, daß die mitzuteilende Darstellungsmethode nicht auf der Spaltung einer präformierten komplizierteren Verbindung beruht.

Nach 48 Stunden wurde die Lösung abgehebert und 1 Stunde zentrifugiert. Die nachfolgende Filtration ging ganz rasch von statten, das Filtrat hatte aber dasselbe opake Aussehen wie die ursprüngliche Lösung. Nun versetzte ich die Flüssigkeit mit Chlorcalcium bis zu einem Gehalt von 0,2 Proz., wobei ein voluminöser, weißer Niederschlag ausfiel. In sehr konzentrierten Extrakten genügt nicht 0,2 Proz. zur quantitativen Abscheidung. Ich erhöhte dann den Zusatz auf 0,3 Proz. $CaCl_2$, was stets ausreichte.

Das Filtrat von diesem Niederschlag war gewöhnlich rötlich gefärbt und etwas opaleszent. Chlorcalcium gab keine Fällung mehr, während Essigsäure sofort eine solche hervorbrachte. Von dieser war oben schon ausführlich die Rede.

Die Chlorcalcium-Fällung kann auf zweierlei Weise in Lösung gebracht werden, durch Zusatz von Ammoniak und von Neutralsalzlösungen. Das erstere Verfahren hat Huiskamp benutzt. Ich will gern zugeben, daß man hierdurch eine weit vollständigere Lösung als nach meinem Verfahren, der Kochsalzmethode, erzielt. Dagegen muß ich meiner Methode insofern bei weitem den Vorzug geben, als sie eine ganz vollständige Extraktion der histonhaltigen Verbindung gestattet, während eine ganze Menge Verunreinigungen ungelöst zurückbleibt. Nach meinem Verfahren erhält man daher eine farblose oder schwach bläulich opaleszierende oder fluoreszierende Flüssigkeit, während Huiskamps Methode ein Filtrat liefert, das ebenso opak ist wie die ursprüngliche Lösung.

Ist die Chlorcalcium-Fällung mit verdünnter Neutralsalzlösung erschöpft, so bleibt ein reichlicher bräunlich-weißer, sehr klebriger Rückstand, welcher kein Histon mehr enthält. Dieser Rest ist in verdünntem Alkali löslich und kann dann aufs neue durch Essigsäure (und Chlorcalcium) niedergeschlagen werden. Da sich das nucleinsaure Histon schon mit 2-proz. Kochsalzlösung extrahieren läßt, wird man wohl kaum annehmen wollen, daß hierdurch eine Spaltung einer mehr komplizierten Histonverbindung stattgefunden hat, was übrigens auch durch die Reaktionen, die später besprochen werden sollen, ausgeschlossen erscheint.

Ich glaube deshalb aus guten Gründen meiner Methode den Vorzug geben zu müssen und habe mich ihrer bei der Untersuchung des nucleinsauren Histons ausschließlich bedient.

Versuchsweise habe ich auch die Darstellungsmethode Malengreaus angewendet. Das Filtrat von dem durch Halbsättigung mit Ammonsulfat im Wasserextrakte der Thymus erzeugten Niederschlag ist, wie schon bemerkt, ganz wasserklar. Es wurde dialysiert, mit 15 Volumen Wasser verdünnt und mit Essigsäure gefällt und der Niederschlag in 500 ccm $1^0/_{00}$ NaOH zu einer neutral reagierenden Lösung gelöst. Eine Probe gab bei Halbsättigung mit Ammonsulfat einen spärlichen Niederschlag. — Bei Sättigung mit Kochsalz trat die Histon-Fällung ein, und im Filtrat ließ sich die Nucleinsäure auf gewöhnliche Weise nachweisen.

In Übereinstimmung mit Malengreau finde ich somit, daß sein B-Nucleoalbumin wesentlich aus nucleinsaurem Histon besteht. Aber nach dieser Methode erhält man kein reines Präparat. Ich habe bei meinen Fraktionierversuchen im Kochsalzextrakte, wie man sich erinnert, eine durch Essigsäure fällbare Substanz vorgefunden, welche erst bei Sättigung mit Ammonsulfat abgeschieden wird. Diese Substanz, welche kein Histon enthält, muß natürlich dem nucleinsauren Histon bei Malengreaus Darstellung beigemengt bleiben. Weiter habe ich gefunden, daß das nucleinsaure Histon sich gegenüber der Einwirkung von Essigsäure durchaus nicht indifferent verhält. Hierüber werde ich später berichten. Endlich läßt sich auch durch Phosphorbestimmungen direkt feststellen, daß Malengreaus B-Nucleoalbumin noch kein reines Präparat darstellt.

Aus dem Gesagten geht klar hervor, daß weder Huiskamps noch Malengreaus Methode sich völlig zur Darstellung reinen nucleinsauren Histons eignen. Es bleibt dann nur meine Methode: Extraktion mit verdünnten Neutralsalzlösungen.

In meiner letzten Publikation habe ich angegeben, daß ich hierzu 5—10-proz. Kochsalzlösung benutzte. Das filtrierte Extrakt gab bei nachfolgender Dialyse einen reichlichen, weißen Niederschlag, während ein Rest in der Lösung zurückblieb, welcher nicht durch Chlorcalcium, wohl aber durch Essigsäure gefällt werden konnte. Die bei der Dialyse ausgefällte Substanz wurde wieder in 5—10-proz. Kochsalzlösung gelöst, und hieraus konnte man das Histon entweder durch Sättigung mit Kochsalz oder durch Zusatz von Salzsäure darstellen. Im ersten Falle wurde das Histon abgeschieden, im letzteren die Nucleinsäure.

Bei erneuter Prüfung habe ich die Richtigkeit dieser Angaben feststellen können und sie in einigen Richtungen vervollständigt. Der nach der Dialyse in Lösung gebliebene Rest besteht aus nucleinsaurem Histon, welches nicht ausgefallen ist. Mit Essigsäure ausgefällt und in einer Spur von Alkali gelöst, wurde er von Chlorcalcium gefällt; der Niederschlag, in Kochsalzlösung gelöst, konnte in Histon und Nucleinsäure zerlegt werden. Überhaupt konnte ich hier keine andere Eiweißverbindung nachweisen als nucleinsaures Histon.

Weiter war es von Interesse, zu untersuchen, in welcher Verbindung das nucleinsaure Histon bei der Dialyse ausgeschieden wird. Bei der Behandlung mit destilliertem Wasser löste sich der Niederschlag rasch, und die Lösung gab mit 0,9-proz. Kochsalzlösung einen reichlichen Niederschlag, welcher sich augenblicklich in überschüssigem Kochsalz wieder löste. Zusatz von Chlorcalcium bewirkte eine reichliche Fällung. Aus diesen Reaktionen geht hervor, daß das nucleinsaure Histon bei

der Dialyse als Natriumverbindung ausgeschieden wird. Wenn also die Ca-Verbindung des nucleinsauren Histons sich in Kochsalzlösung löst, so heißt dies, daß die unlösliche Ca-Verbindung sich in das Na-Salz umsetzt, welches, wie ich schon früher erwiesen habe, in Überschuß von Kochsalz leicht löslich ist. Bei der Dialyse geht Kochsalz fort, und die Na-Verbindung fällt aus, sobald der Kochsalzgehalt auf 0,9 Proz. gesunken ist. Bei dieser Sachlage wird man auch verstehen, daß dabei eine quantitative Ausfällung nicht zu erwarten ist.

Nach mehrmaliger Ausfällung mit Chlorcalcium, Auflösung in 5-proz. Kochsalzlösung, Dialyse u. s. w. erhielt ich Lösungen des nucleinsauren Histons von unzweifelhafter Reinheit, die ich in verschiedenen Richtungen untersuchte.

a) Die Einwirkung von Salzen auf das nucleinsaure Histon.

1. Kochsalz. Wie schon erwähnt, kann man bei Zusatz von Kochsalz eine wässerige Lösung des nucleinsauren Histons als Alkalisalz teilweise fällen. Untersucht man hierfür genauer die Versuchsbedingungen, so findet man, daß bei einem Gehalt von 0,25 Proz. NaCl eine schwache, aber deutliche Opaleszenz eintritt, welche bei 0,50 Proz. stärker wird. Nach einiger Zeit tritt schon hier ein Niederschlag ein, welcher sich bis 0,75 Proz. bis 0,80 Proz. NaCl vermehrt, ohne jedoch quantitativ zu werden. Der Niederschlag tritt als flockige, weiße Fällung auf, geht aber bald in einen durchsichtigen, glasähnlichen Bodensatz von sirupöser Konsistenz über. Wenn dieser sich nach einigen Stunden als Gallerte auf dem Boden des Glases abgesetzt hat, kann man die überstehende Flüssigkeit vollständig abgießen. Setzt man den Zusatz von Kochsalz fort, so bleibt der Niederschlag bis 1,00 Proz. NaCl unverändert, beginnt sich bei 1,25 Proz. NaCl wieder zu lösen und verschwindet bei weiterem Zusatz mehr und mehr. Bei 1,75 Proz. NaCl hat man nur eine schwach opaleszierende Lösung vor sich, und nach einem Zusatz von 2,00 Proz. NaCl ist die Lösung wieder vollständig wasserklar — wie die ursprüngliche Flüssigkeit.

Geht man umgekehrt von einer Lösung des nucleinsauren Histon-Alkalis in 2 Proz. NaCl aus und vermindert den NaCl-Gehalt durch Zusatz von Wasser, so kann man bis 1,50 Proz. NaCl gehen, ohne daß eine Veränderung eintritt. Bei 1,46 Proz. NaCl tritt schwache Opaleszenz ein, wird bei 1,43 Proz. stärker und steigert sich bei 1,40 Proz. NaCl zur Fällung.

Setzt man zu der 2-proz. Lösung mehr Kochsalz, so bleibt sie vollständig unverändert, bis zu 15 Proz. NaCl. Hier beginnt aufs neue ein Niederschlag aufzutreten. Diese Ausfällung ist bei 18 Proz. NaCl beendet. Doch kann man bei vollständiger Sättigung mit Kochsalz eine weitere Fällung beobachten. Untersucht man den durch 15 bis 30 Proz. NaCl entstandenen Niederschlag, so erweist sich dieser als prinzipiell von der Fällung durch 0,7 bis 1,0 Proz. NaCl verschieden. Im ersteren Falle hat eine Spaltung der ursprünglichen Verbindung und

die Ausscheidung des einen Spaltungsproduktes stattgefunden, im letzteren ist die ursprüngliche Verbindung unverändert ausgefallen.

2. Ammonsulfat. Im Hinblick auf Malengreaus B-Nucleoalbumin, das zwischen Halb- und Ganzsättigung mit Ammonsulfat ausfällt, hatte es besonderes Interesse, das Verhalten zu Ammonsulfat zu untersuchen.

In meiner ersten Abhandlung habe ich schon bemerkt, daß man ebenso gut wie Kochsalz auch Ammonsulfat und andere Salze zur Ausfällung des nucleinsauren Histons benutzen kann. Die betreffenden Verhältnisse sind genauer von Huiskamp untersucht worden, und ich brauche hier nur auf seine Angaben zu verweisen. Wie bei anderen Salzen ist auch hier der Niederschlag sehr leicht im Überschuß des Fällungsmittels löslich. Bei noch größerem Zusatz, z. B. Sättigung mit Ammonsulfat, tritt auch hier neuerdings ein Niederschlag auf, welcher aber im Gegensatze zu der NaCl-Fällung aus der unveränderten Substanz besteht.

Genauer bestimmt, erfolgt die Fällung zwischen 70 Sättigungsprozenten (1 ccm nucleinsaures Histon + 2 ccm Wasser + 7 ccm Ammonsulfat-Lösung gibt schwache Opaleszenz) und Sättigung. In sehr konzentrierten Lösungen habe ich eine Verrückung der unteren Fällungsgrenze bis 60 gesehen. Den Fällungsgrenzen nach stimmen somit Malengreaus und mein Nucleoproteid ganz gut überein. Löst man nach Huiskamp den ursprünglichen Chlorcalcium-Niederschlag in verdünntem Ammoniak, so findet man die untere Fällungsgrenze bei etwa 35, — ein ganz verschiedenes Resultat!

3. Magnesiumsulfat gibt, wie die übrigen Salze der Leichtmetalle, bei geringem Zusatz einen Niederschlag, welcher sich beim größeren Zusatz (2 Proz.) wieder löst. Bei Sättigung mit Bittersalz tritt aber überhaupt keine Fällung auf, die Lösung bleibt ganz wasserklar und wird nur dickflüssig, sirupös.

Es ist schwer, zu erklären, warum sich die drei Neutralsalze Kochsalz, Ammonsulfat und Magnesiumsulfat so verschieden verhalten, warum Kochsalz die Verbindung zerlegt und das Histon fällt, während Ammonsulfat das nucleinsaure Histon mit unveränderten Eigenschaften niederschlägt, trotzdem sowohl Kochsalz als Ammonsulfat (und Magnesiumsulfat) wohl das Histon, nicht aber die Nucleinsäure aus ihren Lösungen abscheiden. Die betreffenden Salzwirkungen können somit nicht einfach aus einer Umsetzung der Salze (des nucleinsauren Histons und Kochsalzes) und Ausfällung der unlöslichen Verbindung erklärt werden. Zur genaueren Erforschung dieser Verhältnisse habe ich eine Reihe verschiedener Salze und ihre Wirkungen auf das nucleinsaure Histon untersucht und habe die Resultate in der folgenden Tabelle zusammengestellt (+ bedeutet Spaltung, — keine Spaltung und n. u.: nicht untersucht).

	K	Na	NH_4	Mg	Ca	Ba
1. Chloride . .	+	+	—	—	+	+
2. Bromide . .	+	+	+	n. u.	n. u.	n. u.
3. Jodide . . .	+	+	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
4. Rhodanide .	+	+	+	n. u.	n. u.	n. u.
5. Nitrate . . .	+	+	—	n. u.	n. u.	n. u.
6. Sulfate . .	—	—	—	—	n. u.	n. u.
7. Phosphate .	n. u.	—	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.

Aus der Tabelle geht hervor, daß alle Salze der fixen Alkalien mit einbasischen Säuren das nucleinsaure Histon zerlegen. Ebenso verhalten sich wahrscheinlich Baryum- und Calciumsalze, wie die Chloride andeuten (doch ist hier die Spaltung sehr unvollständig). Dagegen besitzen nur einige Ammoniaksalze der einbasischen Säuren eine spaltende Wirkung (Bromid und Rhodanid), während eine solche bei anderen (Chlorid) vollständig fehlt.

Es fragt sich weiter, ist die Spaltwirkung eine Funktion der Basen- oder der Säurekomponente oder beider, gibt es hier eine Gegenwirkung im Sinne von Paulis Untersuchungen über das Verhalten der Eiweißkörper gegen Elektrolyte, haben wir hier überhaupt eine Ionenwirkung oder eine Salzwirkung vor uns. Wenn Chlornatrium sich positiv und Natriumsulfat negativ verhält, spricht dies für Säurewirkung; daß aber Chlorammonium negativ ist, spricht entschieden gegen eine solche Auffassung und für eine Gegenwirkung der Salz-Komponenten. Auf alle Fälle dürfte man sich die Wirkung in erster Linie als eine Ionenwirkung vorstellen. Zwar stößt diese Vorstellung auf Schwierigkeiten, läßt sich aber experimentell prüfen. Wenn es sich um eine Ionenwirkung handelt, dürfte eine Zurückdrängung der Dissociation, welche in der gesättigten Lösung relativ zwar geringer, absolut aber größer ist als in einer verdünnten, die betreffende Spaltwirkung vermindern. Wenn man weiter hierzu Salze mit gemeinsamen Anionen resp. Kationen benutzt, dürfte man eventuell Einblick in die Wirkung der Säure- bezw. der Basenkomponente erhalten.

I. 3 ccm Histonnucleinat-Lösg. + 2 ccm Wasser + 3 ccm gesätt. NaCl-Lösg.: klar
3 „ „ + 2 „ „ + 4 „ „ „ : beg. Opaleszenz
3 „ „ + 2 „ „ + 4,5 „ „ „ : beg. Fällung.

II. 3 ccm Histonnucleinat-Lösg. + 2 ccm gesätt. $MgCl_2$-Lösg. + 3, 4, 4,5 ccm gesätt. NaCl-Lösung: Ganz wie Versuch I.

III. 3 ccm Histonnucleinat-Lösg. + 2 ccm gesätt. Na_2SO_4-Lösg. + 1 ccm gesätt. NaCl-Lösg.: klar
3 „ „ + 2 „ „ „ + 2 „ gesätt. „ beg. Opaleszenz
3 „ „ + 2 „ „ „ + 2,5 „ gesätt. NaCl-Lösg.: beg. Fällung.

Aus diesen drei Versuchen geht mit großer Wahrscheinlichkeit hervor, daß die Spaltwirkung der Neutralsalze eine Funktion der Basenkomponente nicht aber der Säurekomponente ist, da eine Vermehrung des Basenanteils in einem indifferenten Salz die Spaltwirkung vergrößert, während eine entsprechende Vermehrung des Säureanteils keinen Einfluß ausübt. Wenn weiter die einzelnen Alkalisalze eine so sehr verschiedene Spaltwirkung besitzen, wie z. B. Kochsalz und Natriumsulfat, so läßt sich dies in Übereinstimmung mit dem, was Pauli unter ganz anderen Bedingungen gefunden hat (wenn man statt Kation Basenkomponente setzt), dadurch erklären, daß nur die Basenkomponenten eine Spaltwirkung besitzen, die Säurekomponenten dagegen eine hemmende Wirkung ausüben. Wenn also NH_4Cl sich indifferent, NH_4CNS dagegen positiv verhält, ist dies so zu verstehen, daß der Spaltwirkung des NH_3 zwar von HCl, nicht aber von HCNS das Gleichgewicht gehalten wird.

Daß aber diese Wirkungen Ionenwirkungen sind, geht, soviel ich sehe, nicht aus den Versuchen hervor, eher das Entgegengesetzte. Das Chlormagnesium sollte nämlich die Dissociation ebenso stark zurückdrängen wie das Natriumsulfat und die Spaltwirkung vermindern. Doch halte ich mich nicht für kompetent, hierüber ein bestimmtes Urteil zu fällen.

Ebenso wie die Salze der fixen Alkalien und die Ammoniaksalze fällen die Erdalkalisalze, in geringer Menge zugesetzt, das nucleinsaure Histon und zwar quantitativ. Auch dieser Niederschlag, welcher sich als ein durchsichtiger, sirupöser Bodensatz absetzt, ist im Überschusse des Fällungsmittels leicht löslich. Neutralsalze bewirken dasselbe. In der Lösung findet sich dann das nucleinsaure Histon als Metallsalz der Base des betreffenden Neutralsalzes vor.

Die Salze der schweren Metalle fällen ebenfalls das nucleinsaure Histon als Metallverbindung. Der Niederschlag ist in Salzlösungen unlöslich.

b) Die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf das nucleinsaure Histon.

Das nucleinsaure Histon ist in Wasser ganz unlöslich, dagegen sind die Alkali- und Ammoniakverbindungen leicht löslich; sie sind meines Wissens die einzigen in Wasser löslichen Salze. Im Wasserextrakte aus Thymus kommt das Histonnucleinat höchstwahrscheinlich als Ka-Verbindung vor. Dasselbe muß aber, wie ich später zeigen werde, seiner Konstitution nach als ein saures Salz der Nucleinsäure und des basischen Histon aufgefaßt werden,

welches sich mit Alkali zu einem neutralen Salze verbindet. Übrigens ist es nicht unwahrscheinlich, daß mehrere Alkalisalze existieren. Ich habe gesehen, daß das frisch ausgefällte nucleinsaure Histon-Alkali blaues Lackmuspapier deutlich rötet.

Wirkung von Alkalien und alkalischen Erden.

Setzt man zu einer Lösung des nucleinsauren Histons Alkali, z. B. Natronlauge, so sieht man zunächst keine Änderung. Erst bei 15 bis 20 Proz. NaOH tritt eine Opaleszenz und später ein Niederschlag von Histon auf.

Dagegen gibt Ammoniak, bis zu 5 bis 6 Proz. zugesetzt, schon einen Niederschlag von Histon. Man braucht somit eine weit geringere Menge Ammoniak als Natron, um den Histon-Niederschlag hervorzubringen. Dieser Widerspruch ist jedoch nur ein scheinbarer. Das Histon wird auch von NaOH abgespalten, nicht aber bei dieser Alkaleszenz ausgegeschieden. Ich habe bereits in meiner Histonarbeit gezeigt, daß der Histon-Niederschlag sich schon in 0,1-proz. NaOH wieder löst, und bei diesem NaOH-Gehalt wird das nucleinsaure Histon noch nicht zerlegt. Auch habe ich dort gefunden, daß 20 Proz. Natriumhydroxyd wieder das Histon zur Fällung bringen, was man auch hier sieht. Dagegen ist das Histon viel schwieriger in Ammoniak löslich und wird deswegen, wenn einmal abgespalten, bei derselben Alkaleszenz auch ausgeschieden.

Versetzt man eine Lösung des nucleinsauren Histon-Alkalis mit einigen Tropfen Barytwasser, so bildet sich augenblicklich ein reichlicher, weißer Niederschlag, welcher sehr schwer sowohl in Alkalien und Säuren als Salzlösungen löslich ist. Ebenso verhält sich auch Kalkwasser. Hier ist somit eine ganz andere Reaktion als nach dem Zusatze der betreffenden Salze eingetreten. Untersucht man das Filtrat dieses Niederschlages, so kann man eine schöne Biuretreaktion bemerken. Weiter geben hier Essigsäure, Salzsäure und Ammoniak keine Fällung. Wenn man aber zuerst das Filtrat neutralisiert, gibt der nachfolgende Zusatz von Ammoniak einen reichlichen Niederschlag von Histon, welches somit nicht direkt aus dem barythaltigen Filtrate durch Ammoniak ausgefällt werden konnte.

Es war dann weiter nicht ohne Interesse, zu untersuchen, ob der Niederschlag nach Barytwasserzusatz aus Nucleinsäure bestand. Das war nicht der Fall, da er eine deutliche Biuretreaktion gab. Wenn man aber die Versuchsanordnung in der Weise abänderte, daß man die Lösung des nucleinsauren Histon-Alkalis langsam in das Barytwasser goß, so erhielt man eine vollständige Spaltung: alles Histon war in Lösung geblieben, und der Niederschlag bestand aus reiner Nucleinsäure.

Baryt- und Kalkwasser zerlegen somit das nucleinsaure Histon in seine Komponenten.

Diese Wirkung des Barytwassers ist schon von Kossel zur Darstellung der Nucleinsäure benutzt worden. Kossel hat auch gezeigt, daß die Nucleinsäure als basisches Salz ausgefällt wird, welches mit Essigsäure in das leichtlösliche saure Baryumsalz umgesetzt wird. Ganz ebenso verhielt sich auch meine Nucleinsäure.

Einwirkung von Säuren.

Leitet man anhaltend Kohlensäure durch eine Lösung von nucleinsaurem Histon-Alkali, so kommt es langsam zu einer Fällung von nucleinsaurem Histon, welche jedoch immer ganz unvollständig ist. Einige Tropfen Essigsäure geben einen ähnlichen Niederschlag, welcher aber bei Abwesenheit von Kochsalz absolut quantitativ ist. Die Gegenwart von Kochsalz hindert somit die vollständige Ausfällung, eine Beobachtung, die man auch bei anderen Nucleoproteiden machen kann. Der Niederschlag löst sich sehr leicht auf Zusatz einer Spur von Alkali und wird aus der Lösung bei Zusatz von Chlorcalcium oder von Essigsäure niedergeschlagen. Setzt man aber Essigsäure unvorsichtig im Überschuß hinzu, oder wird das nucleinsaure Histon mehrere Male mit Essigsäure gefällt, so beobachtet man sehr merkliche Veränderungen. Der Körper bleibt zwar immer leicht in Alkali löslich und wird auch von Chlorcalcium niedergeschlagen, die Chlorcalcium-Fällung löst sich aber sehr unvollständig in verdünnten Neutralsalzlösungen, quillt dagegen zu einer voluminösen, gelatinösen Masse auf, welche zwar von Kochsalz bei Sättigung gefällt, aber nur äußerst unvollständig gespalten wird. Man kann sich auch leicht überzeugen, daß die Essigsäure etwas Histon abspaltet, eine Spaltung, welche bei der Anwendung konzentrierter Essigsäure nicht unbedeutend ist.

Mineralsäuren spalten die Verbindung unter Umständen vollständig. Setzt man vorsichtig ganz geringe Spuren hinzu, so wird das nucleinsaure Histon als solches ausgeschieden, aber schon 0,3-proz. HCl spaltet die Verbindung ziemlich vollständig unter Ausscheidung der Nucleinsäure in käseähnlichen weißen Klumpen. Gewöhnlich ist auch das Filtrat milchähnlich getrübt von sehr fein ausgeschiedenen Nucleinsäureresten, die sich nur langsam absetzen. In der Lösung kann man das Histon nachweisen.

Der Nucleinsäure-Niederschlag enthält kleine Mengen Histon, die durch Auflösen und Fällen mit Salzsäure entfernt werden können. Übrigens habe ich in allen Spaltungsversuchen gefunden, daß die Nucleinsäure den letzten Rest Histon besonders schwierig abgibt — eine Beobachtung, die auch Schmiedeberg beim nucleinsauren Protamin aus Lachssperma gemacht hat.

c) Sonstige Eigenschaften des nucleinsauren Histons.

Versetzt man das nucleinsaure Histon-Alkali in wässeriger Lösung mit Alkohol, so erhält man keinen Niederschlag, die Lösung bleibt wasserklar. Fügt man einige Tropfen Kochsalzlösung hinzu, so fällt das nucleinsaure Histon-Alkali nieder und zwar bei genügendem Zusatz quantitativ. Der Niederschlag bleibt leicht in Wasser löslich, und gibt die gewöhnlichen Reaktionen.

Ganz anders verhält sich die Sache, wenn man von einer Lösung von nucleinsaurem Histon-Alkali ausgeht, die mindestens 5 Proz. Kochsalz enthält. In diesem Falle bildet sich sofort auf Alkoholzusatz ein Niederschlag. Dieser besteht aber nicht aus dem unveränderten Körper, sondern aus Nucleinsäure

(mit ein wenig Histon), während der Hauptanteil des Histons sich in dem Alkohol befindet und hieraus durch Ammoniak, am besten nach Verdampfung des Alkohols, niedergeschlagen werden kann. Der Nucleinsäure-Niederschlag hält den Histon-Rest sehr fest zurück, weshalb man ihn zur Entfernung desselben mehrere Male umfällen muß.

Ebenso wie man ohne Gefahr das nucleinsaure Histon-Alkali aus einer kochsalzarmen Lösung mit Alkohol ausfällen kann, läßt sich auch der unlösliche nucleinsaure Histonkalk ohne Schaden mit Alkohol behandeln. Ich habe solche Präparate längere Zeit unter Alkohol verwahrt, ohne daß eine Veränderung eingetreten wäre: Der Körper war immer in 2-proz. Na Cl-Lösung löslich u. s. w.

Wenn man dagegen nach der Alkoholeinwirkung den Körper mit Äther behandelt, resultiert ein schneeweißes, feines Pulver, welches ganz unlöslich ist. Ebenso verhält sich auch das Alkalisalz.

Eine Lösung des nucleinsauren Histon-Alkalis koaguliert beim Kochen, wenn Kochsalz dabei ist. Sonst nicht.

Das nucleinsaure Histon gibt eine schöne Biuretreaktion. Millons Reagens gibt in der Kälte einen weißen Niederschlag, beim Kochen eine rote Lösung.

Auf Grund der Erfahrungen über das nucleinsaure Histon, die ich hier mitgeteilt habe, läßt sich die Darstellung desselben aus Thymus wesentlich vereinfachen.

Vereinfachte Methoden zur Darstellung des nucleinsauren Histons.

Zunächst habe ich den Chlorcalcium-Niederschlag in 2-proz. Kochsalzlösung gelöst und nicht in 5 bis 10-prozentiger. Weiter habe ich die Dialyse des Filtrates unterlassen und dafür das gleiche Volum Wasser zugesetzt. Das nucleinsaure Histon-Alkali schlägt sich nieder, wird in Wasser gelöst, mit Chlorcalcium wieder gefällt u. s. f. Diese einfache Methode ist aber mit einem Mangel behaftet: die Filtration des 2-proz. Kochsalz-Extraktes geht langsam von statten, das Filtrat ist anfangs undurchsichtig, und man muß immer wieder das Filtrat zurückgießen. Nach vielen Stunden ist endlich das Filtrat ganz klar geworden, aber nun geht auch die Filtration äußerst langsam vor sich und ist erst nach Tagen beendet. Das Kochsalz-Extrakt verfällt dabei ziemlich bald der Fäulnis, während das klare Filtrat sehr widerstandsfähig ist. Vermehrt man den Salzgehalt, so wird auch die Zersetzung gehindert, und die Filtration geht viel schneller vor sich.

Diese Schwierigkeit kann man auf zweierlei Weise beseitigen: Entweder man benutzt ein anderes Salz, z. B. Ammonsulfat zur Lösung der Kalkfällung, oder auch man behandelt den Chlorcalcium-Niederschlag zuerst mit Alkohol und läßt nun die 2-proz. Na Cl-Extraktion folgen.

Nach der ersten Methode verreibt man den Chlorcalcium-Niederschlag aus etwa 500 g Thymus innig mit 300 ccm halbgesättigter Ammonsulfatlösung in der Reibschale. Die dickflüssige, grauweiße Mischung ist unbegrenzte Zeit haltbar. Die Filtration geht sehr rasch von statten, und aus dem wasserklaren Filtrat wird das nucleinsaure Histon-Ammoniak durch Sättigung mit Salz abgeschieden. Den Niederschlag löst man in viel Wasser — etwa 1 l — fällt aufs neue mit Chlorcalcium und behandelt den Niederschlag mit 2-proz. Na Cl-Lösung, in welcher er sich schnell und vollständig löst.

Viel bequemer ist die Alkohol-Methode. Der Chlorcalcium-Niederschlag wird zentrifugiert und das Filtrat abgegossen. Man fügt Alkohol (96 Proz.) hinzu, mischt gut und zentrifugiert aufs neue, ohne zu warten. Das Zentrifugieren ist nach 10 Minuten beendet, der Alkohol wird abgegossen, und der Niederschlag wird mit destilliertem Wasser angerührt und nach einigen Stunden filtriert. Der Rückstand wird jetzt mit 50 bis 150 ccm 2-proz. Kochsalzlösung in der Reibschale gut gemischt. Nach 24 Stunden kann man filtrieren. Die Filtration ist rasch beendet, das Filtrat ist ganz wasserklar, schwach bläulich fluoreszierend. (Gewöhnlich extrahiere ich den Rückstand noch einmal mit 2-proz. Na Cl.) Nun kann man entweder das nucleinsaure Histon-Alkali ausfällen, indem man den Kochsalzgehalt auf 1 Proz. herabmindert, den Niederschlag in Wasser lösen und aufs neue mit 0,2-proz. $CaCl_2$ ausfällen, oder man setzt auf einmal so viel Wasser (etwa 1 Liter) hinzu, daß das nucleinsaure Histon-Natrium gleich wieder in Lösung geht und fällt mit Chlorcalcium. Ich ziehe das erste Verfahren vor.

Zur Darstellung der Analysenpräparate fällte ich zweimal (im ganzen also dreimal) mit Chlorcalcium. Nach Alkohol-Äther-Behandlung resultierte ein blendend weißes, feines Pulver, das nicht hygroskopisch war.

Nach der ersten Methode stellte ich Präparat I dar, die übrigen nach der zweiten (und zwar nach beiden Modifikationen). Bei der Darstellung von Präparat III wurden die Extraktionen bei 0° vorgenommen.

Das nucleinsaure Histon-Calcium enthält C, H, N, Ca, P, S, O und Asche. Da die Asche hauptsächlich aus phosphorsaurem Calcium*) besteht, habe ich meine Resultate nicht auf aschefreie Substanz umgerechnet.

*) Die Asche enthält jedenfalls nicht Na Cl.

	C	H	N	S	P	Ca	Asche
Präp. I	43,60 %	5,70 %	16,76 %	—	5,49 %	1,59 %	8,64 %
„ II	43,92 „	5,35 „	16,81 „	0,53 %	5,35 „	—	8,76 „
„ III	43,54 „	5,76 „	17,C5 „	—	5,15 „	1,70 %	8,31 „
„ IV	—	—	—	0,50 %	5,03 „	1,69 „	—
„ V	—	—	—	0,43 „	5,14 „	1,87 „	—
„ VI	—	—	—	0,43 „	5,22 „	1,71 „	—
Mittel	43,69 %	5,60 %	16,87 %	0,47 %	5,23 %	1,71 %	—

Aus den Analysen geht hervor, daß das nucleinsaure Histon-Calcium eine konstante, von den Darstellungsmethoden unabhängige Zusammensetzung hat. Das nucleinsaure Histon ist ein Nucleoproteid sui generis, welches einen ungewöhnlich hohen Phosphorgehalt besitzt.

Vergleicht man das Resultat meiner Analysen mit jenen von Huiskamp und Malengreau, so findet man einen Unterschied ganz in Übereinstimmung mit dem, was man auf Grund der Kritik der Darstellungsmethoden erwarten konnte:

	C	H	N	S	P	Ca
Huiskamp . .	45,01 %	6,49 %	16,96 %	0,50 %	**3,72 %**	1,33 %
Malengreau .	—	—	—	—	**4,50 „**	—
Bang	43,69 %	5,60 %	16,87 %	0,47 %	**5,23 „**	1,71 %

Malengreaus Körper weicht in seinem P-Gehalte nicht besonders von der reinen Substanz ab, während Huiskamps Nucleohiston etwa 30 Proz. Verunreinigungen enthält — vorausgesetzt, daß sie phosphorfrei sind.

Berechnet man aus den Analysen die empirische Formel, so ergibt sich, wenn man vom Calcium ausgeht:

$$C_{85}\, H_{130}\, N_{28}\, S_{0,34}\, P_4\, Ca\, O_{38}.$$

Der Schwefel fordert, wie man sieht, die Verdreifachung dieser Formel: n $(C_{255}\, H_{390}\, N_{84}\, S\, P_{12}\, Ca_3\, O_{114})$ mit einem Molekulargewicht von mindestens: 6974.

	C	H	N	S	P	Ca
Berechnet . . .	43,88	5,60	16,87	0,46	5,33	1,72
Gefunden . . .	43,69	5,60	16,87	0,47	5,23	1,71

Für das „Nucleohiston“ hat Huiskamp die empirische Formel n$(C_{226}\, H_{388}\, N_{73}\, S\, P_7\, Ca_2\, O_{95})$ aufgestellt mit einem Molekulargewicht = 5974. Bei Vergleich mit meiner Formel sieht man den nicht unbedeutenden

Unterschied zwischen unseren Resultaten. So findet man bei Huiskamp das Verhältnis 1 Ca : 3,5 P : 0,5 S und bei mir 1 Ca : 4 P : 0,33 S. Ich habe schon bei der Kritik der Darstellungsmethode Huiskamps mein Urteil über seinen Körper abgegeben.

Ich glaube meine Substanz nach einer Methode, gegen welche kaum berechtigte Einwände erhoben werden können, dargestellt und mit Sicherheit ihre elementare Zusammensetzung festgestellt zu haben. Hiermit haben wir einen guten Ausgangspunkt zur Erforschung der rationellen Zusammensetzung unseres Körpers gewonnen, und darin liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Ich habe schon mehrmals erwähnt, daß das nucleinsaure Histon sich in mehrere Komponenten zerlegen läßt. Man kann die Verbindung auf verschiedene Weise spalten, durch Einwirkung von Baryt, Salzsäure, Kochsalz haltenden Alkohol und Sättigung mit bestimmten Neutralsalzen.

Bei den später mitzuteilenden Untersuchungen habe ich meine ursprüngliche Methode, Sättigung mit Kochsalz, benutzt. Die Resultate derselben bleiben der nächsten Mitteilung vorbehalten.

IX.

Zur Kenntnis der Verdauungs- und Resorptionsvorgänge im Magen.

Von Dr. **Felix Reach** (Karlsbad).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut in Straßburg.

Die Frage, wie weit der Abbau der Eiweißkörper im Magendarmkanale geht, und in welcher Form sie zur Resorption gelangen, ist in den letzten Jahren Gegenstand lebhafter Diskussion gewesen. Früher nahm man ziemlich allgemein an, daß diese Form hauptsächlich die der Peptone wäre. Die nähere Kenntnis der Eiweißkörper, sowie der proteolytischen Fermente haben jedoch unsere Anschauungen wesentlich geändert. Hinsichtlich der Magenverdauung im besonderen war es bis vor kurzem strittig, ob die Peptone die letzten Spaltungsprodukte seien, die die Magenfermente aus dem Eiweiß bilden können. Durch neuere Untersuchungen, namentlich von Lawrow*) und Langstein**), ist es jedoch außer Zweifel gesetzt, daß auch diese Fermente krystallinische Endprodukte bilden. Dies wird nun allerdings in vitro, namentlich bei Anwendung von Pepsinpräparaten erst nach sehr lange dauernder Verdauung nachweisbar. Aber auch aus anderen Gründen dürfen solche Resultate nicht ohne weiteres auf den lebenden Organismus übertragen werden; die Versuche mit künstlicher Verdauung können schon darum keinen erschöpfenden Aufschluß darüber geben, wie die Aufspaltung im Magen wirklich abläuft, weil der in vita gegebene, von nervösen Einflüssen sinnvoll geregelte Fortgang der Sekretion, Resorption und mechanischen Weiterbeförderung vorläufig keine befriedigende Nachahmung im Experiment gestattet. Ich erinnere überdies daran, daß die Art der Darstellung der Fermente auf ihre Wirksamkeit von nicht unwesentlichem Einflusse ist. So konnte Glaessner***) zeigen, daß die ganze Magenschleimhaut Pseudopepsin bildet, ein Ferment,

*) Lawrow, Zeitschr. f. physiolog. Chemie **26**.
) Langstein, Diese Beiträge **1.
***) Glaessner, Diese Beiträge **1**.

dessen Wirkung unter anderem durch das Auftreten der Tryptophanreaktion kenntlich ist und das in den gebräuchlichsten Pepsinpräparaten zu fehlen pflegt.

Bei jenen Versuchen, bei denen der Verdauungsvorgang im lebenden Magen mit Hülfe der Analyse des Mageninhalts untersucht wurde, waren stets nur wenig Peptone und entferntere Verdauungsprodukte nachweisbar. Ich verweise in dieser Richtung insbesondere auf die jüngsten Untersuchungen von Zunz*), denen sich die meinigen hinsichtlich der Versuchsanordnung anschließen.

Zunz untersuchte den Inhalt des Magens (und Dünndarms) von Hunden bestimmte Zeit nach der Mahlzeit und war bemüht, durch sorgfältige Bestimmungen die im Magen auftretenden Verdauungsprodukte quantitativ zu ermitteln. Ein Teil der Versuche wurde an intakten Tieren ausgeführt, in einem anderen Teile unterband er den Pylorus so, daß die Fortschaffung der Verdauungsprodukte aus dem Magen in den Darm verhindert war. Mit überraschender Regelmäßigkeit fand er, wenn er Hunden gekochtes Fleisch verabreicht hatte, annähernd 90 Proz. des nicht koagulabeln Stickstoffs in Form von Albumosen wieder, ohne daß die Dauer der Verdauung darauf von merklichem Einflusse gewesen wäre.

Dieses Verhalten läßt sich in doppelter Weise deuten: entweder es stellt die Bildung einer Verdauungslösung mit 90 Proz. Albumosenstickstoff einen Grenzwert für die im Magen überhaupt erreichbare Verdauungswirkung dar, oder die Zusammensetzung der im Magen befindlichen Verdauungslösung wird durch die Resorption der entfernteren Verdauungsprodukte derart geregelt, daß ihr Stickstoffgehalt den Grenzwert von etwa 10 Proz. des Gesamt-N der Verdauungslösung nicht übersteigt. Durch Weiterbeförderung in den Dünndarm könnte diese Regelung nicht erfolgen — eine Sonderung der in Lösung befindlichen Albumosen und der anderen Produkte wäre so schlechterdings unverständlich — sondern sie könnte nur dadurch bewirkt sein, daß ein Teil der Verdauungsprodukte schon im Magen resorbiert wird. Es ist von vornherein mit Zunz anzunehmen, daß dieser Resorption die krystallinischen Endprodukte in höherem Maße anheim fallen, als die nicht krystallinischen Peptoide und Peptone, und diese letzteren wieder in höherem als die noch weniger diffusibeln Albumosen.

Welche von diesen zwei Möglichkeiten zutrifft, läßt sich durch einen einfachen Versuch prüfen. Bringt man den beiderseits

*) Zunz, Diese Beiträge 3.

unterbundenen Magen eines verdauenden Hundes sofort nach Entnahme in eine feuchte, auf Körpertemperatur gehaltene Kammer, so wird die Resorption, soweit sie durch das kreisende Blut vermittelt wird, aufgehoben, während die Bedingungen der chemischen Spaltung zunächst die gleichen bleiben wie im Leben. Von Resorptionsvorgängen kann dann allenfalls für die erste Zeit eine Aufnahme von Verdauungsprodukten seitens der Magenmucosa in Frage kommen, die aber bei dem Umstande, daß die Beförderung der aufgenommenen Produkte ausgeschlossen ist, nur mit einem sehr niedrigen Wert veranschlagt werden kann. Daß bei einem derart isolierten Magen noch eine merkliche Sekretion fortbesteht, ist zu bezweifeln; jedenfalls ist eine Veränderung in der Zusammensetzung des Mageninhalts durch hineingelangtes Sekret nicht anzunehmen. Es muß sich daher bei dieser Anordnung zeigen, ob die während des Lebens in den Magen übertretenden Fermente in ihrer Wirkung bei dem beobachteten Grenzwert von etwa 90 Proz. Albumosen-N halt machen oder nicht.

Dem Gesagten entsprechend prüfte ich diese Frage unter Anwendung folgender Versuchsanordnung: Mittelgroße Hunde, die zwei Tage gefastet hatten, wurden mit ausgekochtem Fleisch gefüttert; zwei Stunden hernach wurde der Magen an beiden Enden abgebunden und herausgenommen. Die Verdauung wurde nun noch durch 4 Stunden bei Bluttemperatur in der feuchten Kammer fortgesetzt. Nach dieser Zeit wurde der Mageninhalt entleert, mit Wasser versetzt, neutralisiert und das Eiweiß durch Koagulation ausgefällt. Im Filtrat wurde die Stickstoffverteilung ermittelt.

Es wurde nach Kjeldahl bestimmt:

1. Der Gesamt-N.

2. Der Stickstoff der durch Sättigung mit $ZnSO_4$ bei saurer Reaktion fällbaren Substanzen nach Zunz: „Albumosen-N."

3. Der Stickstoff der aus saurer mit $ZnSO_4$ gesättigter Lösung durch Pikrinsäure fällbaren Stoffe: „Pepton-N."

Im Hinblick auf den letzten Punkt bedarf es einer erläuternden Bemerkung. Zur Trennung der Peptone, Peptoide [noch komplexer aber keine Biuretreaktion mehr gebender Substanzen*)] und krystallinischen Endprodukte mangelt es zur Zeit noch an einer vollkommenen Methode. Die vielfach angewandte Phosphorwolframsäurefällung scheidet mit den Peptonen mindestens auch gewisse Endprodukte wie das Histidin, Arginin und Lysin ab. —

*) Hofmeister in „Ergebnisse der Physiologie", herausgegeben von Asher und Spiro, I. Jahrgang, S. 786.

Salicyl-Sulfonsäure soll zwar nach Mac Williams die Peptone in mit Ammoniumsulfat gesättigter Lösung ausfällen, ich kann jedoch nicht bestätigen, daß diese Fällung eine quantitative ist, fand vielmehr bei Anstellung entsprechender Versuche im Filtrate stets eine, wenn auch schwache, Biuretreaktion. Außerdem wäre diese Art der Fällung für die Messung durch Stickstoffbestimmung wegen des verwendeten Ammonsulfats unbrauchbar. Aber auch bei Anwendung von Zinksulfat statt Ammonsulfat kann man die Biuretreaktion nicht vollständig zum Verschwinden bringen. Hingegen gelang mir dies durch Ausfällen der mit Zinksulfat gesättigten Lösung mit Pikrinsäure.

Das durch Zinksulfatsättigung nach Zunz erhaltene albumosenfreie Filtrat wurde nochmals in stärkerem Maße angesäuert (auf 10 Teile Filtrat 1 Teil verdünnter Schwefelsäure), dann wurde Pikrinsäure in Substanz im Überschusse zugesetzt. Dieses Gemenge wurde zur Lösung der Pikrinsäure eine kurze Zeit bei 40° gehalten und nach dem Abkühlen filtriert. Um ein klares Filtrat zu erhalten, war es stets nötig, vor dem Filtrieren die Flüssigkeit mit etwas Talkum zu schütteln. Das Filtrat wurde zur Entfernung der Pikrinsäure wiederholt mit Äther kräftig ausgeschüttelt. Bereits nach dem zweiten Schütteln war die Farbe der Pikrinsäure in der Regel vollständig aus der wässerigen Lösung verschwunden, doch wurde dann stets noch zweimal geschüttelt. Auf diese Art konnte sowohl aus Witte-Pepton als auch aus dem Verdauungsgemisch von Fleisch oder Fibrin ein vollkommen biuretfreies Filtrat erhalten werden. Ich überzeugte mich ferner, daß Arginin und Histidin in mit Zinksulfat gesättigter Pikrinsäurelösung löslich sind. Inwieweit etwa andere Körper, die nicht Peptone sind, bei diesem Verfahren aus Verdauungsgemischen gefällt werden — beim Lysin ist es von vornherein sehr wahrscheinlich — muß noch Gegenstand der Untersuchung sein.

Im folgenden sollen der Kürze halber alle Substanzen, welche aus zinksulfatgesättigter Lösung durch Pikrinsäure gefällt werden, schlechtweg als „Peptone", der Rest als „Endprodukte" bezeichnet werden.

Über die Ergebnisse der Tierversuche gibt die folgende Tabelle Aufschluß:

Versuchs-Nr.	Verfütterte Fleischmenge	Im verflüssigten Mageninhalt gefunden in Prozenten des nichtkoagulabeln Gesamt-Stickstoffs in Form von			
		Albumosen	Peptonen	Endprodukten	Peptonen und Endprodukten
1.	100 g	56,4	—	—	43,6
2.	200 g	48,7	19,9	31,4	51,3
3.	300 g	32,2	35,0	32,8	67,8
4.	400 g	37,9	30,1	32,0	62,1

Die Zahlen zeigen zunächst für jene drei Fälle, in denen die „Endprodukte" gesondert bestimmt wurden, übereinstimmend etwas

mehr als 30 Proz. des Gesamtstickstoffes in dieser Form. Für die „Peptone“ schwanken die Werte zwischen 19 und 35 Proz., für die Albumosen zwischen 32 und 56 Proz. Im Vergleiche mit den oben erwähnten Ergebnissen von Zunz geht daraus hervor, daß der bei intravitaler Verdauung gefundene Wert von etwa 90 Proz. Albumosen-Stickstoff nicht in einer Beschränkung der Fermentwirkung seinen Grund hat, sondern in einem gleichzeitig stattfindenden selektiven Resorptionsvorgang, durch welchen die neben den Albumosen entstehenden oder von ihnen abstammenden einfacheren Produkte — Peptone, Peptoide, vielleicht auch krystallinische Endprodukte — sobald ihre Menge eine gewisse Größe (etwa 10 Proz. des Gesamt-N) überschreitet, rasch entfernt werden.

In obiger Tabelle zeigt sich weiter, daß bei größerer Fleischration die relative Menge der Albumosen kleiner, die der Peptone und Endprodukte größer, also die Verdauung weiter fortgeschritten war, was sich vielleicht durch stärkere Anregung zur Sekretion erklären läßt. Die Versuchsreihe ist jedoch zu klein, um in dieser Hinsicht zu weitgehenden Schlüssen zu berechtigen.

Im Anschlusse an diese Mitteilung möge eine Notiz über das Pseudopepsin Platz finden. Glaessner*) konnte dieses Ferment durch folgende Merkmale vom Pepsin unterscheiden: Seine Wirkung hat nicht nur bei saurer, sondern auch bei neutraler und schwach alkalischer Wirkung statt und führt zur Bildung von Proteinochromogen. Es ist minder widerstandsfähig als das Pepsin, so daß die von Glaessner geübte Darstellung der Fermente durch Uranylfällung nur zu Pepsinlösungen führt. Die pars pylorica produziert nur Pseudopepsin. — Klug**) hat neuerdings die Existenz des Pseudopepsins bestritten.

Im Hinblick auf die Differenz zwischen der Wirkung des Magensekrets in vita und künstlicher Pepsinpräparate in vitro dürfte es nun von Interesse sein, daß auch andere Maßnahmen als die Uranylfällung einerseits bei der beide Fermente beherbergenden Fundusschleimhaut zu wirksamen Fermentlösungen führen, die die Wirkung des Glaessnerschen Pseudopepsins nicht mehr haben, andererseits bei der nach Glaessner bloß Pseudopepsin bildenden Pylorusschleimhaut die Fermentwirkung überhaupt aufheben. Vollständig erreicht man dieses Verschwinden der Pseudopepsinwirkung, wenn man die Schleimhaut nach der Zerkleinerung auf Tonplatten lufttrocken werden läßt und dann mit Quarzsand zu einem feinen vollständig trockenen Pulver zer-

*) Glaessner, l. c.
**) Klug, Pflügers Archiv 92.

reibt. Bei Behandlung mit Alkohol ist ein ähnlicher Erfolg zu verzeichnen, doch minder vollkommen insofern, als eine mit Alkohol geschüttelte und mehrere Wochen in demselben aufbewahrte Pylorusschleimhaut durch Digestion bei schwach alkalischer Reaktion immer noch ein Extrakt gibt, das koaguliertes Blutserum (in Mettschen Röhrchen) bei saurer Reaktion merklich verdaut. — Bei kürzer dauernder Behandlung mit Alkohol wird das Pseudopepsin noch weniger zerstört.

Es ist zu vermuten, daß der quantitative Unterschied, der hinsichtlich der verschiedenen Verdauungsprodukte zwischen der Verdauung in vita und jener in vitro besteht, wenigstens zum Teil auf der Abwesenheit des Pseudopepsins in den künstlichen Pepsinpräparaten beruht. Jedenfalls ist das Pseudopepsin weiterer Untersuchungen wert.

X.

Zur Kenntnis der Ochronose.

Von Dr. med. et phil. **Leo Langstein.**

(Aus dem patholog. Institut des Krankenhauses Friedrichshain in Berlin. Vorsteher: Prof. v. Hansemann.)

Im Jahre 1866 teilte Virchow[1]) mit, daß er bei einer von ihm obduzierten Leiche eine intensive Schwarzfärbung fast sämtlicher Knorpel gefunden habe. Er gab diesem bisher noch nicht bekannten pathologisch-anatomischen Bild den Namen „Ochronose".

Bis zum heutigen Tage sind außer diesem klassischen Fall Virchows noch fünf weitere bekannt geworden. Dieselben sind beschrieben von Boström[2]), von v. Hansemann[3]), von Heile[4]), von Hecker und Wolf[5]), der letzte aus Wien von Albrecht[6]) und Zdarek[7]).

So genau wir durch die gründlichen Untersuchungen der genannten Forscher über die bei der Ochronose gefundenen anatomischen Veränderungen orientiert sind, unsere Einsicht in das Wesen dieses seltenen pathologisch-anatomischen Bildes haben sie nicht gefördert; denn ein tieferes Verständnis desselben kann uns naturgemäß nur das Studium der chemischen Veränderungen gewähren, denen der Knorpel in diesen Fällen unterlag. Ein solches bietet jedoch erst Aussicht auf Erfolg, seit uns die biochemische Forschung die Zusammensetzung des normalen Knorpels gelehrt hat, was erst in den 90er Jahren, also lange, nachdem die ersten Fälle von Ochronose beschrieben waren, der Fall war; allerdings konnten auch vorher gewisse Anhaltspunkte über die chemische Natur des Prozesses, der die Schwarzfärbung der Knorpel hervorrief, durch ein eigentümliches Verhalten des Harns gewonnen werden, das in der Mehrzahl der Fälle sicher vorhanden war und von den Autoren mit dem Namen „Melanurie" bezeichnet wurde.

Der Harn zeigte nämlich — ich betone dies ausdrücklich — bei der Entleerung eine dunkelschwarze Farbe; nur in zwei

Fällen wird angegeben, daß der Harn mit normaler Farbe gelassen und erst allmählich beim Stehen an der Luft tief dunkel wurde.

Es muß wundernehmen, daß genauere Untersuchungen über die Natur des die Schwarzfärbung des Harnes bedingenden Körpers nicht vorliegen, wenn man bedenkt, daß einige der Autoren angeben, das betreffende Individuum habe jahrelang vor seinem Tode dunkelgefärbten Urin entleert; allerdings gewann ja diese anamnestische Angabe erst ihre Bedeutung durch das Ergebnis der Obduktion, also zu einer Zeit, da es zu einer systematischen Harnuntersuchung meist schon zu spät war.

In Betreff der Erklärung des veränderten Chemismus glaubt Virchow an die Verwandtschaft des Farbstoffes mit Hämatinderivaten; Boström, Heile, Hecker und Wolf reihen ihn in die Gruppe der Melanine. Zu einer anderen Auffassung kamen Albrecht und Zdarek, die den Wiener Fall eingehender untersuchten.

Dieser, während seiner letzten Lebenstage auf der Abteilung von Kovacs beobachtet, entleerte einen dunkel bis schokoladebraun gefärbten Harn, der auf Zusatz von Kupfersulfat dunkelrot wurde. Manchmal soll der Harn auch mit natürlicher Farbe gelassen worden sein und erst beim Stehen nachgedunkelt haben.

Als die Obduktion den Befund der Ochronose ergab, wurde der Residualharn (20 ccm) von Zdarek im Ludwigschen Laboratorium genauer untersucht. Das Ergebnis war folgendes. Der Harn reduzierte Fehlingsche Lösung und ammoniakalische Silberlösung. Die wässerige Lösung der durch Äther extrahierten Substanzen gab mit verdünnter Eisenchloridlösung eine rasch verschwindende Grünfärbung. Homogentisinsäure oder Uroleucinsäure darzustellen gelang nicht. Der die Schwarzfärbung bedingende Körper, aus Knorpel und Harn dargestellt, war stickstoffhaltig und nicht in krystallisiertem Zustand zu gewinnen. Die Untersuchung der Knorpel auf Chondroitinschwefelsäure zeitigte kein irgendwie verwertbares Resultat.

Albrecht und Zdarek nehmen auf Grund der chemischen Untersuchung an, daß bei der Bildung des schwarzen Farbstoffes in den Knorpeln die Chondroitinschwefelsäure eine gewisse Rolle spielt, indem ein Abkömmling der Alkaptonsäuren (Homogentisinsäure und Uroleucinsäure) in einer bis jetzt nicht näher charakterisierten Art und Weise in Verbindung mit diesem charakteristischen Derivat des Knorpels tritt; die Schwarzfärbung des Harnes leiten die genannten Forscher von der Ausscheidung einer Alkaptonsäure oder eines Derivates derselben ab. Die Anschauung jedoch, daß der schwarze Farbstoff im Knorpel und Harn ein Derivat des Blutfarbstoffs oder den Melaninen verwandt sei, weisen sie von der Hand.

Nach dieser Auffassung ist die Ochronose das pathologisch anatomische Bild der von Baumann[8]) entdeckten interessanten Stoffwechselanomalie, der Alkaptonurie.

Nicht vereinbar mit dieser Auffassung ist das im folgenden mitzuteilende Resultat der Untersuchung eines Harnes, der einem Falle von Ochronose entstammt. Ich verdanke denselben der großen Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. v. Hansemann, auf dessen Anregung ich die Untersuchung ausführte.

Der Harn entstammte dem von v. Hansemann beschriebenen Fall von Ochronose, bei dem auch während des Lebens Melanurie bestand. Der Harn, in einer zugeschmolzenen Glasröhre aufbewahrt, war tintenschwarz gefärbt. Er reduzierte weder Fehlingsche Lösung noch ammoniakalische Silberlösung; durch Äther ließ sich keine Substanz extrahieren, die mit Eisenchlorid in der für Alkaptonsäuren charakteristischen Weise reagierte. Homogentisinsäure und Uroleucinsäure ließen sich aus dem Harne nicht darstellen. Es fehlten also sämtliche Merkmale, die der Harn eines Alkaptonurikers zeigt.

Schon die Färbung des Harnes war eine andere als die eines noch so lange aufbewahrten Alkaptonharns, der mir zum Vergleich glücklicherweise zur Verfügung stand und die Reaktion mit Eisenchlorid wie die Reduktionsproben in ausgesprochenster Weise zeigte. Die Farbe des Harns, der in dem von Hansemannschen Falle zur Ausscheidung gelangte, ähnelte mehr der einer Flüssigkeit, die Eiweißmelanine enthält. Hier war die Melanurie also sicherlich nicht durch die Ausscheidung einer Alkaptonsäure bedingt, und wir werden uns auf Grund dieses Ergebnisses zu fragen haben, in wieweit die Anschauung Albrechts und Zdareks von einem engen Zusammenhang zwischen Alkaptonurie und Ochronose zu Recht besteht.

Eigentlich sprach in dem Wiener Fall nur eine einzige Reaktion dafür, daß eine der beiden für Alkaptonurie charakteristischen Dioxysäuren mit dem Harn entleert wurde: das ist die Grünfärbung, die der Harn bei der Mischung mit verdünnter Eisenchloridlösung annahm. Hingegen mißlang die Darstellung der Alkaptonsäuren, die auch bei Anwesenheit geringer Mengen immer zu einem Resultat führt, und die die Schwarzfärbung bedingende Substanz erwies sich als stickstoffhaltig. Die Reduktion im Sinne der Anwesenheit der Dioxysäuren zu verwerten, geht nicht an, da dieselbe nicht dem in den Äther übergegangenen Anteil des Harnes zukam, sondern dem nicht ätherlöslichen Rückstand.

Aus alledem, zusammengehalten mit den Ergebnissen meiner Harnuntersuchung, geht wohl hervor, daß die Annahme einer genetischen Beziehung zwischen Alkaptonurie und Ochronose in den beobachteten Tatsachen kaum Rückhalt findet. Die Frage nach dem Wesen der Ochronose bleibt nach wie vor eine offene.

Sich durch Incision auf den Knorpel bei Alkaptonurie unmittelbar Anschauung von dem Zustand derselben zu verschaffen, dürfte selten möglich sein. Infolge eines günstigen Zufalls kann ich aus eigener Erfahrung an einem von mir an der medizinischen Klinik in Basel viele Wochen lang beobachteten Fall mitteilen, daß die Ohrknorpel nicht die geringste Veränderung, nicht die Spur einer Verfärbung, aufwiesen*). Gegen den engen Zusammenhang zwischen Alkaptonurie und Ochronose spricht ferner der Umstand, daß bisher kein einziger Fall von jener beschrieben wurde, indem der Harn bei der Entleerung eine dunkle Farbe zeigte, — eine Angabe, die sich bei den bisher bekannt gewordenen Fällen von Ochronose verhältnismäßig häufig findet.

Der Annahme Albrechts, daß es sich bei der Ochronose um eine Stoffwechselanomalie handelt, wird man vollkommen beistimmen müssen; ob die Alkaptonurie dabei eine Rolle spielt, ist nicht ausgemacht. Ich neige mehr der Anschauung zu, daß wir es mit einer pathologischen Melaninbildung zu tun haben und zwar sowohl auf Grund der Beschaffenheit des von mir untersuchten Harnes, als auch wegen der nach anderer Richtung hin negativ verlaufenen Untersuchungen.

Zur Stütze dieser Annahme können die neueren Forschungen herangezogen werden, die sich mit der Melaninbildung aus Eiweiß befassen. In dieser Hinsicht besonders wichtig sind die Beobachtungen, die gezeigt haben, daß sich die Melanine im tierischen Organismus durch Fermentwirkung bilden können. Ich erinnere nur an die interessanten Befunde von v. Fürth und Schneider[9]), daß sich durch tierische Tyrosinase aus Tyrosin ein melaninähnliches Pigment bildet, sowie an das Experiment Přibrams[10]), der durch frisch entnommenen Tintenbeutel von Sepia officinalis Tyrosin in schwarzes Pigment überführte. Man könnte auch bei der Ochronose an eine fermentative Melaninbildung aus Tyrosin oder einer der anderen melaninbildenden Gruppen des Eiweißmoleküls, über die wir nun durch die Arbeiten Samuelys[11]) genauer orientiert sind, denken. Die Färbung der Knorpel selbst beruht ja, wie v. Hansemann gezeigt hat, auf einer Imbibition mit dem gelösten Farbstoff, der wohl einem abnormen Verlauf des intermediären Stoffwechsels seine Ent-

---

*) Ich glaube nicht, daß die Alkaptonurie eine so seltene Stoffwechselanomalie ist, daß bisher nur sechs Fälle zur Sektion gelangten. Bedenken wir doch, welch große Anzahl von Fällen mit Alkaptonurie allein von englischen Forschern gesehen wurde.

stehung verdankt und sich durch Imbibition eben dort anhäuft, wo ein träger Stoffwechsel existiert, wie in Knorpeln, Sehnen, elastischen Membranen u. s. w.

Literatur.

1) Virchow, Virch. Arch. 1866, **37**, 217.
2) Boström, Festschrift für Virchow **2**, 179.
3) v. Hansemann, Berlin. klin. Wochenschr. 1892, S. 27.
4) Heile, Virch. Arch. **160**, 448, 4 u. 5.
5) Hecker u. Wolf, Festschr. zur Feier des 50jähr. Bestehens d. Stadt-Krankenh. zu Dresden.
6) Albrecht, Zeitschr. f. Heilkunde. 1902, S. 366.
7) Zdarek, Zeitschr. f. Heilkunde. 1902, S. 377.
8) Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**, 228.
9) v. Fürth u. Schneider, Diese Beiträge **1**, 229 f.
10) Přibram, H., Diese Beiträge **1**, 241.
11) Samuely, Diese Beiträge **2**, 355.

XI.

Der Brechungskoeffizient der Eiweißkörper des Blutserums.

Von Dr. **Emil Reiss.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

Zur Differenzierung der Eiweißkörper des Blutserums wurde in letzter Zeit vorwiegend die Methode der fraktionierten Salzfällung herangezogen. Man erhielt auf diese Weise drei Globulinfraktionen, die — in vieler Beziehung einander gleich — sich immerhin durch einige Eigenschaften als chemisch verschieden erwiesen. In der Serumalbuminfraktion konnte ein krystallisierender Bestandteil von einem amorph ausfallenden unterschieden werden. Zur genaueren Charakterisierung dieser einzelnen Körper erschien die Prüfung weiterer physikalischer Eigenschaften von Interesse.

Obwohl die starke Lichtbrechung der Eiweißkörper schon seit längerer Zeit bekannt ist, wurde sie doch unseres Wissens bisher nicht als Unterscheidungsmerkmal benutzt. Die Größe der Lichtbrechung wird bekanntlich ausgedrückt durch den Brechungskoeffizienten. Sein Wert steht in enger Beziehung zum Atombezw. Molekulargewicht. Verschiedenartige Verkettung, Ionisierung und andere Momente haben auf ihn jedoch einen so bedeutenden Einfluß, daß nur in homologen Reihen eine wirkliche Regelmäßigkeit zu erkennen ist. Körper von ganz verschiedenem Molekulargewicht können daher den gleichen Brechungsexponenten haben und umgekehrt. Verschiedene Brechungskoeffizienten zweier Körper zeigen jedoch stets deren Verschiedenheit an.

Die Untersuchungen wurden mit dem Pulfrichschen Eintauchrefraktometer ausgeführt, das eine genaue Temperaturregulierung ermöglicht.

Die Darstellung der verwendeten Eiweißkörper geschah durch Fällung mit Ammonsulfat.

Um die möglichste Reinheit der einzelnen Fraktionen zu sichern, wurden diejenigen prozentualen Anteile, bei welchen zwei benachbarte Körper gemeinsam ausfallen, ausgeschaltet. Z. B.: Euglobulin ist erst bei 36 Proz. Ammonsulfatsättigung ausgefällt, Pseudoglobulin I beginnt aber schon bei 32 Proz. sich abzuscheiden. Es wurde daher der Niederschlag von 32 bis 36 Proz. beseitigt. So erhielten wir als Euglobulin eine bis 32 Proz., als Pseudoglobulin I eine von 36 bis 39 Proz., als Pseudoglobulin II eine von 42 bis 50 Proz. ausfallende Fraktion. Die so erhaltenen Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst, noch zweimal umgefällt und dann 4 bis 6 Wochen gegen Leitungswasser dialysiert.

Aus dem Filtrat des mit Ammonsulfat halbgesättigten Serums wurde das kristallisierte Albumin durch vorsichtigen Zusatz von $^1/_5$ Normal-Schwefelsäure gewonnen und noch zweimal umkristallisiert. Die von Kristallen befreite Albuminlösung wurde als amorphes Albumin betrachtet, obwohl anzunehmen war, daß sie noch geringe Mengen kristallisierten Albumins enthielt. Die beiden Albumine wurden gleichfalls 4 bis 6 Wochen der Dialyse unterworfen.

Das Euglobulin mußte nach der Dialyse behufs der Untersuchung durch Salzzusatz gelöst werden.

Es geschah das bei einer Probe durch Zufügen einer gemessenen Menge konzentrierter Kochsalzlösung. Mit destilliertem Wasser wurde eine gleichprozentige Kochsalzlösung hergestellt und in beiden Lösungen die Lichtbrechung untersucht. Die Differenz mußte den Ausschlag des Brechungsexponenten für Eiweiß darstellen.

Zu einer anderen Euglobulinprobe wurde Kochsalz in Substanz zugefügt, der Salzgehalt der Lösung quantitativ bestimmt, und dieser Wert, in den Brechungskoeffizienten umgerechnet, von der Gesamtbrechung der Lösung abgezogen.

Bei den übrigen Eiweißkörpern konnte ohne weiteres die Bestimmung des Brechungsexponenten vorgenommen werden. Um den Wert für reines Eiweiß zu erhalten, mußte hiervon der Brechungsanteil der Salze abgezogen werden.

Es wurde daher, nachdem festgestellt war, daß die Lösungen kein Ammonsulfat mehr enthielten, ihr Salzgehalt bestimmt. Das geschah durch Erhitzen bis zur Verkohlung, dann Auslaugen und Veraschen nach bekannter Methode. Es ergab sich, daß der Salzgehalt der Lösungen mit ihrem Eiweißgehalt abnahm, also bei der Dialyse von einer größeren Eiweißmenge auch eine größere Salzmenge zurückgehalten worden war. Die Lösungen, deren Eiweißgehalt ein geringer war, entsprachen in ihrem Salzgehalt dem Leitungswasser. Es wurde daher für diesen der Brechungsexponent des Leitungswassers in Rechnung gesetzt. Auch hielten wir uns für berechtigt, dementsprechend den Brechungsexponenten des Salzgehalts höherprozentiger Lösungen zu berechnen. Wenngleich wir nicht sicher wissen konnten, ob die Zusammensetzung der Salze dieser Lösungen wirklich derjenigen im Leitungswasser entsprach, so waren doch, zumal es sich um sehr kleine Werte

handelte, keine in Betracht kommenden Abweichungen zu befürchten.

Sämtliche Eiweißbestimmungen wurden nach Fällung mit 3 bis 4 Volumen Alkohol und einstündigem Erhitzen auf etwa 80° durch Trocknen und Wägung vorgenommen. Hiernach wurde unter Abzug der Asche der Brechungsindex für 1 Proz. Eiweiß berechnet.

Wo die Menge der Lösung ausreichte, wurde auch die optische Aktivität untersucht.

In allen Fällen wurden Doppelbestimmungen gemacht.

Um ein Beispiel der außerordentlichen Exaktheit der Methode zu geben, lassen wir eine genauere Tabelle der Bestimmung des kristallisierten Serumalbumins folgen. Es wurden hier Verdünnungen im Verhältnis von $^2/_3$ und $^1/_3$ der Stammlösung mit Leitungswasser hergestellt. Die Ungenauigkeiten der Verdünnung wurden vom Brechungskoeffizienten deutlich angegeben. Aus der Differenz des Brechungskoeffizienten, sowie des Eiweiß- und Salzgehalts der drei Lösungen und des Brunnenwassers wurde der Ausschlag des Brechungskoeffizienten für 1 Proz. Eiweiß berechnet.

	n_D der Lösung	Differenz	Salzgehalt	n_D der Salze	Differenz	n_D des Eiweißgehalts	Eiweißgehalt	Differenz	n_D für 1 % Eiweiß
Stammlösung	1,33551		0,0420 %	1,33333			1,0730 %		
		0,00071			0,00004	0,00067		0,3240 %	0,00201
Verdünnung auf $^2/_3$	1,33480		0,0312 %	1,33329			0,7490 %		
		0,00077			0,00002	0,00075		0,3745 %	0,00200
Verdünnung auf $^1/_3$	1,33403		0,0232 %	1,33327			0,3745 %		
		0,00078			0,00002	0,00076		0,3745 %	0,00203
Leitungswasser	1,33325		0,0162 %	1,33325			0		

Die gute Übereinstimmung der Endresultate in den drei Bestimmungen beweist eine außerordentliche Genauigkeit der Methode. In gleicher oder ähnlicher Weise wurden sämtliche Eiweißfraktionen des Blutserums untersucht und folgende Resultate erhalten:

	Euglobulin	Pseudoglobulin I	Pseudoglobulin II	Kristallisiertes Albumin	Amorphes Albumin	Gesamteiweiß
Anteil von n_D für 1 % Eiweiß	0,00230	0,00224	0,00230	0,00201	0,00183	0,00172
Spezifische Drehung	— 52°			— 61,5°	— 33,3°	

Die Tabelle zeigt zunächst, daß die Globuline das Licht stärker brechen als die Albumine. Unter letzteren ist wieder das kristallisierte Albumin das stärker lichtbrechende. Da die Lösung von amorphem Albumin wahrscheinlich Beimengungen des kristallisierten enthielt, dürfte der Brechungsindex für das reine amorphe Albumin noch etwas niedriger zu setzen sein. Dagegen weisen die Globuline untereinander keine wesentlichen Unterschiede auf. Bei der Bestimmung des Pseudoglobulin I mußte mit einer sehr stark verdünnten Lösung operiert werden und daher mag die Berechnung etwas ungenau ausgefallen sein. Indes ist die beobachtete Abweichung nicht groß genug, als daß darin ein Unterschied gegen die anderen Globuline gefunden werden könnte. Die Erwartung, die einzelnen Globulinfraktionen durch ihr Lichtbrechungsvermögen unterscheiden zu können, hat sich also nicht erfüllt. Würden bedeutendere Verschiedenheiten zwischen ihnen bestehen, so müßten sie bei den so nahe verwandten Körpern im Brechungskoeffizienten zum Ausdruck kommen. Es ist daher die Schlußfolgerung gegeben, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Globulinen derart sind, daß sie in der physikalischen Eigenschaft der Lichtbrechung nicht zu Tage treten. Das stimmt mit allem, was wir sonst über die Zusammensetzung und das reaktionelle Verhalten der Globuline wissen, überein. Diese Momente würden an sich eine Unterscheidung derselben nicht ermöglichen*). Auf die anscheinend großen Differenzen, die bezüglich der optischen Aktivität gefunden wurden, möchten wir keinen Wert legen, weil hier die Methodik zu große Fehler in sich schließt. Die Tatsache, daß Lysine, Toxine, Präzipitine mit bestimmten Globulinfraktionen ausfallen, ist kein Beweis für die Verschiedenheit dieser Fraktionen. Diese in so bestimmter Weise wirksamen Substanzen haben mit den Globulinen nur die Eigenschaft gemein, sich bei einem bestimmten Salzgehalt, und zwar dem Eiweißniederschlag anhaftend, abzuscheiden. Daß sie an die Globuline nicht fest gebunden sind, beweist die in verschiedenen Fällen ganz ungleich große Ausbeute. Als Unterscheidungsmerkmal der Globuline unter sich bleibt somit in der Hauptsache nur die Fällbarkeit durch verschieden hohe Salzkonzentrationen übrig.

Die in der letzten Spalte der Tabelle aufgeführte Zahl gibt den Anteil des Brechungsexponenten für 1 Proz. Gesamteiweiß wieder. Sie ergab sich mit großer Konstanz aus der Untersuchung von Menschen- sowie von Pferdeblutserum. Merkwürdigerweise

*) Vgl. Porges und Spiro, Diese Beiträge **3**, 284 ff.

liegt sie niedriger als alle anderen Werte; das Gesamteiweiß hat also eine geringere Lichtbrechung als die einzelnen durch die Salzfällung gewonnenen Eiweißteile. Zur Erklärung wäre zunächst daran zu denken, daß das Serum eine klare Lösung darstellt, während die isolierten Globuline im Wasser anscheinend nur feine Suspensionen bilden. Indessen hat nach allen Erfahrungen eine Substanz in Suspension eine geringere und nicht wie hier eine größere Lichtbrechung als in Lösung. Ferner ist der Brechungsindex des kristallisierten Serumalbumins, das eine schöne Lösung darstellt, immer noch höher als der des Gesamteiweiß. Die Erklärung dieses scheinbaren Widerspruchs muß daher weiterer Untersuchung vorbehalten bleiben.

XII.

Über die Wirkungsweise des Trypsins.

Von **Moritz Schwarzschild** (Köln).

(Aus dem physiolog.-chemischen Institute zu Straßburg.)

I.

Um über den Mechanismus der tryptischen Eiweißverdauung Aufschluß zu erhalten, stellte Gulewitsch*) in Kossels Laboratorium eine Reihe von Versuchen an, in denen er Trypsin auf einfach gebaute, ihrer Konstitution nach wohlbekannte chemische Körper einwirken ließ. Die hierbei verwendeten 19 Verbindungen lieferten ein negatives Resultat, insofern es Gulewitsch nicht gelang, eine Spaltung der betreffenden Körper nachzuweisen. Nur in Versuchen mit p-Diacetylamidophenol war die abgespaltene Menge Essigsäure in den Trypsinversuchen größer als in den Kontrollversuchen.

Diese interessanten Versuche wurden von Gulewitsch nicht fortgeführt. Daher habe ich auf Vorschlag Herrn Professor Hofmeisters es unternommen, eine Reihe anderer Körper nach dieser Richtung hin zu untersuchen**). Namentlich sind es zwei Gruppen von Verbindungen, die herangezogen wurden, einerseits Säureamide, andererseits Biuretreaktion gebende Substanzen, letztere besonders deshalb, weil die Vermutung gerechtfertigt erschien, daß dieselben in ihrem Bau Ähnlichkeit mit den Peptonen besitzen. Es kamen zur Untersuchung: Asparagin, Acetamid, Harnstoff, Benzamid, Oxamid, Biuret, Oktaspartsäure, die Curtiussche Glycinbase, Malondiamid, Glycinamid, Äthyloxamid, Amido-

*) Zeitschrift f. physiolog. Chemie 27, 540.

**) Die Versuche sind im Frühjahre 1901 begonnen worden und waren Juli 1902 im wesentlichen beendet. Sie wurden in Hofmeisters Vortrag „Über den Bau des Eiweißmoleküls“ auf der 74. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Karlsbad 1902 sowie in dessen Arbeit „Über Bau und Gruppierung der Eiweißkörper“ in den „Ergebnissen der Physiologie“, Wiesbaden 1902 kurz erwähnt. Auf eine im Herbste 1902 publizierte Arbeit von Dr. Gonnermann, in welcher dieser neben der Wirkung anderer Fermente auch jene des Trypsins auf Amide untersuchte, komme ich weiter unten mit einigen Worten zurück.

oxalazid, Monophenyloxamid. Außerhalb dieser Reihe wurden noch untersucht: Hippursäure und Piperazin.

Die Präparate wurden teils von Merck bezogen, teils von mir dargestellt. Die Reinheit der von Merck bezogenen Präparate wurde durch Feststellung des Schmelzpunktes geprüft. Proben der fünf letzten oben genannten Körper aus der Reihe der Biuretreaktion gebenden Säureamide verdanke ich dem liebenswürdigen Entgegenkommen des Herrn Professor Schiff in Florenz, welcher sie dem hiesigen Laboratorium zur Verfügung stellte und dem ich hiermit meinen ergebensten Dank ausspreche.

Gewinnung des Trypsins.

Schwierig gestaltete sich zum Teil die Darstellung eines geeigneten Trypsinpräparates. Während nämlich das von Grübler bezogene Trypsin, das ich weiterhin als Trypsin A bezeichnen werde, sich bei den Amiden für die Versuchsanordnung als brauchbar erwies, konnte ich dasselbe nicht benutzen zur Entscheidung der Frage, ob die die Biuretreaktion gebenden Körper gespalten seien oder nicht. Denn die Trypsinpräparate, die ich in Händen hatte, gaben selbst mehr oder minder deutlich die Biuretreaktion. Ich ging deshalb darauf aus, selbst ein Trypsinpräparat darzustellen (Trypsin B), das einerseits keine Biuretreaktion geben, andererseits frei sein sollte von anderen Fermenten. Zur Darstellung eines solchen erwies sich die Uranylacetatmethode, die von Jacoby*) zuerst angewandt, dann auch von Glaessner**) und Rosell***) mit Erfolg benutzt worden war, als geeignet. Es gelang mir zwar trotz vieler Versuche, die wiederholt und in den verschiedensten Modifikationen ausgeführt wurden, nicht, ein Präparat darzustellen, das völlig frei war von Kohlehydrat — die Reaktion nach Molisch war immer positiv —, erreichte aber doch, daß dasselbe absolut frei war von jeglicher Spur von Biuretreaktion. Sehr wichtig war es ferner, das Trypsin von den übrigen Pankreasfermenten zu befreien. Bereits Rosell hatte gefunden, daß bei Anwendung der Uranylacetatmethode das diastatische Ferment zerstört wird, auch das lipolytische erhielt er nicht immer. Indem ich nun außerdem noch die Autolyse benutzte, erhielt ich eine Trypsinlösung, die stets frei war von diastatischem und lipolytischem Fermente. Die Darstellung gestaltete sich folgendermaßen:

10 Rinderpankreas wurden zu feinem Brei zerhackt, mit wenig Natriumbikarbonat versetzt und mit Toluol überschichtet. Das Gemenge

*) Zeitschr. für physiolog. Chemie **30**, 135.
) Diese Beiträge **1, 1.
***) Inaugural-Dissert. Straßburg 1901.

wurde auf der Schüttelmaschine gut durchgeschüttelt und dann während 5 bis 6 Tagen der Autodigestion überlassen. [Es stellte sich dabei heraus, daß, je länger die Autodigestion anhielt, um so unwirksamer die Trypsinlösung wurde. Dauerte die Selbstverdauung länger als 10 Tage, so war das Trypsin zerstört.] Nach dieser Zeit wurde koliert und so lange filtriert, bis eine klare Flüssigkeit resultierte. Diese enthielt noch reichlich Eiweiß. Um letzteres zu entfernen, wurde die Flüssigkeit mit gesättigter Uranylacetatlösung und dann sofort, um die Reaktion alkalisch zu erhalten, mit Natriumphosphat versetzt. Es entstand ein voluminöser Niederschlag, der das Trypsin enthielt. Von diesem wurde abfiltriert, der Filterrückstand in der Reibschale mit 0,2-proz. Natriumkarbonatlösung ausgezogen. Dabei geht sämtliches Ferment in die Karbonatlösung über. Um eine möglichst gut wirkende Fermentlösung zu erhalten, ist es notwendig, den Niederschlag mindestens 12 Stunden mit der Karbonatlösung stehen zu lassen. Das Filtrat ist dann sehr wirksam.

Die Verdauungskraft der so dargestellten, keine Biuretreaktion darbietenden Lösungen wurde regelmäßig geprüft, indem ich 5 ccm derselben unter Toluol auf ein Mettsches Röhrchen, das koaguliertes Pferdeblutserum*) enthielt, einwirken ließ. Meine Trypsinlösungen pflegten bei 40° in 24 Stunden 8 bis 10 mm der Eiweißsäule zu lösen.

II. Versuche.

Die Versuche betreffs Einwirkung des Trypsins auf die zu untersuchenden Stoffe wurden so angestellt, daß etwa 0,1 bis 0,3 g Substanz mit 5 bis 10 ccm Trypsinlösung versetzt und mit Toluol überschichtet wurden. Um sicher zu sein, daß nur das Trypsin eine etwa eingetretene Spaltung bewirkt hatte, wurden regelmäßig Kontrollversuche derart angestellt, daß dieselbe Menge Substanz mit 5 bis 10 ccm der gleichen Trypsinlösung, nachdem sie ½ Stunde lang am Rückflußkühler gekocht hatte, zusammengebracht wurde. Die Mischungen wurden im Brutofen in Reagenzgläsern oder kleinen Kölbchen digeriert. Über die Art und Weise, nach der auf eine etwa eingetretene Spaltung geprüft wurde, werde ich besonders bei den einzelnen Gruppen der Stoffe berichten.

1. Hippursäure.

Im Laboratorium von Nencki hatte Blank**) gefunden, daß Hippursäure durch Trypsin in Benzoesäure und Glykokoll sich zerlegen lasse. Dagegen gelang es Gulewitsch***) nicht, eine solche Spaltung zu beweisen. Gulewitsch vermutet, daß das Trypsinpräparat Blanks mit dem fettspaltenden Fermente verunreinigt gewesen sei. Auch mir gelang es nicht, die Spaltung der Hippursäure zu erreichen.

---

*) Vergl. Glaessner, loc. cit.
**) Archiv f. experim. Pathologie 20, 377.
***) Zeitschr. f. physiolog. Chemie 27, 540.

0,5 g hippursaures Natrium wurden mit 15 ccm Trypsinlösung — die Versuche wurden sowohl mit Trypsin A als mit Trypsin B wiederholt angestellt, — unter Zusatz von Toluol während 48 Stunden digeriert. Dann wurde filtriert, das Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert und mit Petroläther gut ausgeschüttelt. Nach Verdunstung des Petroläthers verblieb nur ein ganz geringer Rückstand, der keine Benzoesäurekristalle erkennen ließ.

Es blieb nun noch die Möglichkeit, daß irgend ein anderes Ferment des Pankreas, das vielleicht von den Zellen selbst eingeschlossen wird, diese Zerlegung herbeiführt. Um dies zu erfahren, setzte ich zu 0,5 g hippursauren Natriums frisch erhaltenes, klein gehacktes Pankreas und überließ die Mischung während 2 bis 8 Tagen der Digestion. Mit dem Filtrate wurde, wie oben angegeben, verfahren. Benzoesäure erhielt ich in keinem der zahlreich angestellten Versuche.

2 bis 6. Asparagin, Acetamid, Harnstoff, Benzamid, Piperazin.

Bei der Untersuchung dieser Körper ging ich von der Erwägung aus, daß, falls durch Einwirkung des Trypsins Ammoniak abgespalten wird, dieser sich durch Destillation mit Magnesia im Vakuum bestimmen läßt. Vorversuche zeigten, daß die betreffenden Körper für sich mit Magnesia im Vakuum destilliert, keinen Stickstoff abspalten — eine Ausnahme bildet nur das Oxamid — wohl aber die angewandten Trypsinpräparate.

Versuchsanordnung. Zur Bestimmung des locker gebundenen Stickstoffs erhitzte ich die zu untersuchende Mischung mit Magnesia und fing das ausgetriebene Ammoniak über $^1/_{10}$ Norm.-Schwefelsäure auf. Bei Zusatz von Magnesia zu der zu destillierenden Flüssigkeit ist große Vorsicht geboten, da Trypsin A, wenn ihm Magnesia zugesetzt wird, bereits in der Kälte Ammoniak entwickelt. Ich benutzte hierbei einen Apparat, der ähnlich dem von Nencki*) angegebenen konstruiert war. Um die Destillation schnell und vollkommen vor sich gehen zu lassen, leitete ich durch den die Flüssigkeit aufnehmenden Kolben in langsamem Strome Luft, die ich noch in vorgelegter Schwefelsäure wusch. Die Temperatur bei der Destillation überstieg nie 45°.

a) Versuche mit Trypsin A.

α) Kontrollversuch.

Präparat	Dauer der Dig.	Gewichtsmenge	Ausgetriebener N in Proz.	Mittelwert
Trypsin A	—	0,3828	18,54	
Trypsin A	—	0,4198	18,54	18,57 Proz.
Trypsin A	38 Stunden	0,4146	18,64	

*) Archiv f. experim. Pathol. 36, 385.

β) Hauptversuch.

Präparat	Dauer der Dig.	Gewichtsmenge	Ausgetriebener N in Proz. berechnet auf das verwendete Trypsin	
Trypsin A Asparagin	38 Stunden	0,3663 0,1457	19,09	19,29 Proz.
Trypsin A Asparagin	5 Tage	0,4278 0,2827	19,49	
Trypsin A Acetamid	4 Tage	0,3761 0,4889	18,91	
Trypsin A Harnstoff	4 Tage	0,4445 0,3112	18,33	
Trypsin A Benzamid	4 Tage	0,5291 0,4149	18,60	

b) Versuche mit Trypsin B.

α) Kontrollversuch.

Gewichtsmenge	Dauer der Dig.	Ausgetr. N in Proz. des verwendeten Trypsins	
0,1255	6 Wochen	2,23	
0,1255	8 Wochen	1,90	
0,1255	3 Monate	0,78	0,72 Proz.
0,1255	3 Monate	0,67	

Bei den Versuchen mit Trypsin B wurde, um genaue Zahlen zu erhalten, das Trockengewicht von 5 ccm genau abgemessener Fermentlösung bestimmt, das sich im Mittel auf 0,1255 g stellte.

Es ergab sich, wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, daß die Menge des abspaltbaren Ammoniaks abnahm, je länger man die Lösung der Digestion überließ.

β) Hauptversuch.

Präparat	Dauer der Dig.	Gewichtsmenge	Ausgetr. N in Proz. des verwendeten Trypsins	Mittelwert
Trypsin B Asparagin	6 Wochen	0,1255 0,3321	2,23 Proz.	2,09 Proz.
Trypsin B Asparagin	6 Wochen	0,1255 0,5670	1,95 Proz.	
Trypsin B Piperazin	3 Monate	0,1255 0,1218	0,78 Proz.	0,83 Proz.
Trypsin B Piperazin	3 Monate	0,1255 0,1317	0,89 Proz.	

7. Oxamid.

Da es sich herausstellte, daß Oxamid selbst, mit Magnesia destilliert, bereits Ammoniak abspaltet, so stellte ich die Versuche derart an, daß ich zu gleicher Zeit Oxamid mit wirksamem und mit abgetötetem Trypsin B der Digestion unterwarf, beide Proben unter genau denselben Verhältnissen hielt und auf dieselbe Weise später destillierte. Ich teile nachstehend eine derartige Versuchsreihe mit.

Präparat	Gewichts-menge	Summe des abgesp. N in g	Abgespaltener N des Trypsins in g	Abgespaltener N des Oxamids in g	Abgespaltener N des Oxamids in %	Dauer der Digestion
Oxamid + Trypsin B	0,1821 0,1255	0,02226	0,00084	0,02142	**11,76**	3 Monate
Oxamid + unwirksames Trypsin B	0,1536 0,1255	0,01820	0,00084	0,01736	**11,30**	3 Monate

Aus der Betrachtung dieser Tabellen geht hervor, daß es nicht gelang, Ammoniak durch Trypsin aus den Amiden abzuspalten.

8. Oktaspartsäureanhydrid.

E. Schaal*) hat durch längeres Erhitzen von salzsaurem Asparagin im Kohlensäurestrom zwei Verbindungen erhalten, welche er als Anhydride der Asparaginsäure erkannte von der Zusammensetzung

$$C_{16}H_{14}N_4O_9 = 4\,C_4H_7NO_4 - 7\,H_2O$$
$$C_{32}H_{26}N_8O_{17} = 8\,C_4H_7NO_4 - 15\,H_2O$$

H. Schiff**) gab dann eine bequemere Methode zur Darstellung dieser Anhydride, die er als Oktaspartid und Tetraspartid bezeichnet. Man erhitzt trockene Asparaginsäure etwa 20 Stunden lang im Ölbad auf 190 bis 200°. Oberhalb 200° tritt schwache Gelbfärbung ein. Das Rohprodukt wird dann mit der zehnfachen Menge Wasser ausgekocht. Dann bleibt das Oktaspartid ungelöst. Aus der kochend abfiltrierten Flüssigkeit scheidet sich beim Erkalten das Tetraspartid als sehr feines Pulver ab. Beim Eindampfen erhält man eine weitere kleinere Menge desselben. Weiter fand dann H. Schiff, daß die stark konzentrierte Flüssigkeit noch zwei weitere Verbindungen enthielt, die er als

Oktaspartsäure $C_{32}H_{42}N_8O_{25} = 8\,C_4H_7NO_4 - 7\,H_2O$
und Tetraspartsäure $C_{16}H_{22}N_4O_{13} = 4\,C_4H_7NO_4 - 3\,H_2O$ ansprach.

*) Ann. d. Chemie **157**, 26 (1872.)
) Ber. d deutsch. chem. Ges. **30, 3, 2449.

E. Grimaux*) fand 1882, daß die Schaalschen Aspartide in Kali gelöst und mit wenig Kupfersulfat versetzt, die sog. Biuretreaktion geben. Da nun nach Schiff die Polyaspartide mit Kali die Salze der entsprechenden Aspartsäuren bilden, so kommt die Biuretreaktion diesen letzteren zu.

Nach Vorschrift Schiffs stellte ich mir ein Präparat des Oktaspartid durch Erhitzen im Autoklaven her. Die Biuretreaktion, die das Präparat zeigte, war aber zu gering, um, allein auf das Verschwinden derselben gestützt, die Frage zu beantworten, ob eine Spaltung eingetreten sei. (An einem von Prof. Schiff mir gütigst überlassenen Präparate wurde auch diese zum Maßstabe genommen.) Nun aber gibt das Oktaspartid, mit Kupferkarbonat gekocht, kein Kupfersalz, während Asparaginsäure, in die ja die Polyaspartsäuren gespalten werden mußten, ein charakteristisches Kupfersalz liefert.

Versuch 1.

0,5 g Oktaspartid wurden mit 15 ccm einer Trypsinlösung B unter Toluol in den Brutschrank gebracht. Nach 4 Wochen wurde das Gelöste vom Ungelösten abfiltriert, vom Toluol befreit und mit Kupferkarbonat gekocht, filtriert, eingeengt und erkalten gelassen. Es scheiden sich keine Kristalle ab.

Versuch 2.

Dieselbe Anordnung wie bei 1, mit demselben negativen Resultate.

Auch eine Versuchsreihe mit Pepsin-Salzsäure lieferte ein negatives Resultat.

Bei Versuchen mit ausgesprochen die Biuretreaktion gebenden Körpern suchte ich eine eingetretene Spaltung der betreffenden Körper dadurch nachzuweisen, daß ich ermittelte, ob die Biuretreaktion verschwunden sei oder nicht. Es wurden etwa 0,1 bis 0,3 g Substanz mit 5 ccm Trypsin B versetzt und zur Kontrolle dieselbe Substanzmenge mit 5 ccm abgetöteter Trypsinlösung der Digestion überlassen. Die Prüfung auf Vorhandensein der Biuretreaktion wurde möglichst quantitativ gemacht, um vergleichbare Versuchsresultate zu erhalten: Es wurden zu genau 1 ccm der Lösung in der Regel 3 Tropfen Natronlauge und 1 bis 2 Tropfen verdünnter Kupfersulfatlösung zugesetzt.

9. Biuret.

Gulewitsch**) hat bereits angegeben, daß die Biuretreaktion des mit Trypsin digerierten Biurets selbst bei dreimonatlicher Digestion nicht verschwindet. Bei meinen Versuchen, in denen

*) Bull. soc. chim. 38, 69 (1882).

**) Zeitschr. f. physiolog. Chemie 27, 551.

ich ebenfalls 3 Monate lang das Trypsin B auf Biuret einwirken ließ, kam ich zu demselben negativen Resultate.

10 bis 11 (8). Malondiamid, salzsaures Glycinamid, Oktaspartsäureanhydrid.

Das sauer reagierende Glycinamid wird durch Natriumkarbonat zuerst alkalisch gemacht. Nach 5 Wochen dauernder Trypsineinwirkung zeigen Proben dieses Körpers noch deutliche Biuretreaktion. In wenig sehr verdünnter Natronlauge gelöstes Oktaspartsäureanhydrid, sowie das in Wasser gelöste Malondiamid zeigten dasselbe Verhalten.

12 bis 14. Äthyloxamid, Monophenyloxamid, Amidoxalazid.

Diese drei Körper sind nur in heißem Wasser löslich, Monophenyloxamid selbst in diesem äußerst schlecht, sodaß die Biuretreaktion bereits vor der Digestion eine schwache ist. Beim Erkalten fallen die Körper aus, gehen aber bei Brutschranktemperatur wieder in Lösung. Die Digestion mit Trypsin wurde nach 4 Wochen unterbrochen. Äthyloxamid zeigt noch sehr starke Biuretreaktion, Monophenyloxamid nur eine schwache, jedoch nicht schwächer als die der Kontrollprobe. Die Biuretreaktion des Amidoxalazids, die nach 14 Tagen noch sehr stark war, ist verschwunden. Doch auch die Kontrollprobe zeigt keine Biuretreaktion mehr. Es war demnach bei keinem der genannten Körper eine durch Trypsin veranlaßte Spaltung nachweisbar.

15. Curtiussche Base.

Gelegentlich seiner Studien über das Glykokoll fand Curtius*), daß der Glykokolläthylester die Fähigkeit hat, in eine hochschmelzende Base überzugehen, die eine intensive Biuretreaktion gibt. Nach dem Verfahren von Curtius**) stellte ich mir zunächst den salzsauren Glykokolläthylester dar, aus dem ich nach der Methode von E. Fischer***) den freien Ester gewann. Das erforderliche Glykokoll wurde später durch Hydrolyse des Leims nach Angabe von E. Fischer†) gewonnen. Aus dem Glykokolläthylester gewann ich die Base, indem ich den Ester in den Exsikkator brachte, diesen evakuierte und das Präparat sich selbst überließ. Bevor ich nun daran ging, den Körper hinsichtlich seiner Spaltbarkeit zu untersuchen, versuchte ich zu einer Erkenntnis

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **16**, 1, 753.
) Journal f. prakt. Chemie **37, 159.
***) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **34**, 436.
†) Zeitschr. f. physiol. Chemie **35**, 70.

seiner Konstitution zu gelangen. Schon H. Schiff*) gab der Vermutung Ausdruck, daß die Biuretbase in der Weise aus dem Glykokolläthylester entstehe, daß mehrere Moleküle des Esters unter Austritt von Alkohol sich verketten zu:

$$\begin{array}{ccc} & NH_2 & \vdots & NH_2 \\ & | & \vdots & | \\ C_2H_5{-}CO_2{-} & CH & \vdots\ CO{-} & CH{-} \end{array}$$

Nun hat E. Fischer**) gezeigt, daß man ausgehend vom Glycinanhydrid $\begin{matrix} NH\,CH_2\,CO \\ |\qquad\quad | \\ CO\,CH_2\,NH \end{matrix}$ zu Körpern gelangt, die aus mehreren Glykokollmolekülen sich zusammensetzen. Er nennt das Radikal des Glykokolls $CH_2\,NH_2\,CO$ Glycyl und erhielt einen Körper, der sich als Glycylglycin herausstellte: $NH_2\,CH_2\,CO\,NH\,CH_2\,CO\,OH$. Der Äthylester dieses Körpers ist durch seine Neigung ausgezeichnet, sich durch Alkoholabspaltung in Glycinanhydrid zurückzuverwandeln. Diese Umwandlung tritt selbst beim Aufbewahren in trockenem Zustande ein. Gleichzeitig tritt aber auch ein anderer Körper auf, der die Biuretreaktion gibt und den Fischer für identisch mit der Curtiusschen Biuretbase hält. Es hatte also offenbar eine Kondensation unter Alkoholabspaltung stattgefunden. Es ist überdies von E. Fischer festgestellt, daß eine Verkettung von Aminosäuren zu größeren Komplexen, „Peptiden", zum Teil unter Auftreten der Biuretreaktion unter verschiedenen Bedingungen erreichbar ist.

Man mußte demnach daran denken, daß auch bei der Aufbewahrung des Glykokolläthylesters eine Kondensation unter Alkoholabspaltung stattfinde. Um eine Vorstellung zu gewinnen, wie viele Glycyle sich in der Curtiusschen Base etwa vereinigt finden, stellte ich zunächst in mehreren Versuchen die Basizität des Körpers durch Titration mit $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure fest.

a) 0,0448 g	Substanz	neutralisieren	1,0	ccm $^1/_{10}$ Norm.-H_2SO_4
b) 0,0403 g	„	„	0,95	ccm $^1/_{10}$ Norm.-H_2SO_4
c) 0,1515 g	„	„	3,4	ccm $^1/_{10}$ Norm.-H_2SO_4

Es würde sich danach für das Molekulargewicht ergeben:

Gemäß der 1. Bestimmung	448
„ „ 2. „	421
„ „ 3. „	445
im Mittel demnach	438

Nach dieser Zahl müßten sich behufs Bildung der Curtiusschen Base mindestens 7 Glykokollmoleküle vereinigen.

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **30**, 3, 2457.
) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **34, 2, 2868.

Die Analyse ergibt in Übereinstimmung hiermit, daß in der Tat 7 Glykokollmoleküle in der Curtiusschen Verbindung enthalten sind, lehrt aber weiter, daß in derselben ein Äthylrest erhalten bleibt.

Behufs Entfernung der letzten Reste von unverändertem Ester wurde auf eine wiederholte Destillation des Produktes im Vakuum Gewicht gelegt, wobei der unveränderte Ester völlig überging und die reine Base zurückblieb.

Präparat I.

a) 0,1874 g über Schwefelsäure getrockneter Substanz gaben 0,2968 g CO_2 und 0,1056 g H_2O.
0,1544 g Substanz gaben 28,58 ccm N bei 13,1° und 757 mm.
b) 0,1756 g „ „ 0,2763 g CO_2 und 0,0994 g H_2O.

Präparat II.

a) 0,1970 g Substanz gaben 0,3127 g CO_2 und 0,1164 g H_2O.
b) 0,2171 g „ „ 0,3438 g CO_2 „ 0,1234 g H_2O.
0,1424 g „ „ 25,97 ccm N bei 17,1° und 761,5 mm.

Präparat III.

a) 0,1732 g Substanz banden nach Kjeldahl 27,15 ccm $^1/_{10}$ Norm.-H_2SO_4.
b) 0,1558 g „ gaben 29,9 ccm N bei 21,7° und 757,5 mm.

In folgender Tabelle stelle ich die Prozentzahlen zusammen und stelle zum Vergleiche die von Curtius ermittelten Zahlen daneben.

Berechnet auf $C_{16}H_{27}N_7O_8$	Curtius	Schwarzschild						Mittel
		Präparat I		Präparat II		Präparat III		
C = 43,15 Proz.	42,28	43,19	42,91	43,29	43,19	—	—	43,14
H = 6,07 Proz.	6,67	6,26	6,29	6,56	6,31	—	—	6,30
N = 22,02 Proz.	20,64	21,89	—	—	21,35	21,77	21,94 (Kjeldahl)	21,74

Es stimmen demnach die erhaltenen Analysenzahlen gut mit der Formel $C_{16}H_{17}N_7O_8$.

Die Zahlen weichen aber von den zuerst von Curtius gefundenen wesentlich ab. Auch das Verhalten meines Präparates beim Erhitzen entsprach in wiederholten Versuchen nicht ganz den Angaben von Curtius. Meine Präparate begannen bei 187 bis 190° sich dunkler zu färben, nahmen bei 196° einen bräunlichen Ton an und waren bei 240 bis 260° schwarz. Curtius findet, daß der Körper sich bereits bei 150° dunkler färbte, bei 160° zu schmelzen begann und bei 178° völlig mit gelber Farbe unter Zersetzung geschmolzen erschien. Die Ursache dieser Verschiedenheiten könnte in dem Umstande zu suchen sein, daß das Präparat von Curtius noch eine kleine Menge des nicht kondensierten Esters beigemengt enthielt.

Da nach dem Ergebnis der Analyse in dem Körper eine Äthylgruppe zu vermuten war, so versuchte ich durch vorsichtige

Spaltung dieselbe nachzuweisen. Es gelang mir nur, wenn ich kurze Zeit verdünnte Schwefelsäure einwirken ließ.

0,3 g der Biuretbase wurden mit verdünnter Schwefelsäure ½ Stunde lang am Rückflußkühler gekocht, dann wurde sofort das erhaltene Produkt destilliert. Die ersten übergehenden Tropfen geben die Liebensche Jodoformprobe. Es setzten sich typische, rosettenartige Kristalle von Jodoform ab, ebenso sechsseitige Tafeln. Dabei trat deutlicher Geruch von Jodoform auf.

Daß bei einer solchen Spaltung aus der Biuretbase wieder Glykokoll erhalten wurde, konnte ich in einem anderen Versuche, nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryumkarbonat, durch Darstellung der typischen blauen Glykokollkupferkristalle zeigen.

Auf Grund der mitgeteilten Befunde muß die Curtiussche Base als ein Hexaglycylglycinäthylester

$$NH_2\,CH_2CO(NH\,CH_2\,CO)_5\,NHCH_2\,.\,CO\,.\,OC_2H_5$$

aufgefaßt werden. Diese Formel erklärt auch die Fähigkeit der Substanz, die Biuretreaktion zu geben. Zum Zustandekommen derselben bedarf es nach Schiff*) mindestens zweier Gruppen folgender Art:

$$CONH_2,\ CNHNH_2,\ CH_2NH_2,\ CSNH_2,$$

welche an ein einziges Atom Kohlenstoff oder Stickstoff gebunden, oder direkt untereinander vereinigt sind. Betrachtet man nun die oben aufgestellte Formel, so enthält diese die Gruppe

$$\begin{array}{l} CH_2-NH_2 \\ | \\ CO-NH, \end{array}$$

die nach dem Gesagten wohl die Biuretreaktion bedingen kann.

Es wurde dann ferner das Verhalten der Curtiusschen Base gegenüber salpetriger Säure geprüft, da möglicherweise zu erwarten war, daß unter bestimmten Bedingungen bloß der Stickstoff der NH_2-Gruppe abgespalten würde, nicht aber jener der NHCO-Gruppen. Eine quantitative Methode zur Bestimmung des auf diese Weise abspaltbaren Stickstoffs ist von H. Meyer**) angegeben. Diese, die sich auf Grund von Kontrollversuchen für meine Zwecke als sehr brauchbar erwies, wurde in etwas abgeänderter Form in Anwendung gebracht***). Das Ergebnis war unerwarteterweise ein negatives.

---

*) Berichte der deutsch. chem. Ges. **29**, 298, ferner Annalen **299**, 236. Vergl. hierzu Hofmeister l. c.

**) Anleitung zur quantitativen Bestimmung der organischen Atomgruppen. Berlin 1897.

***) Für das von H. Meyer angegebene Verfahren gelingt es leicht, einen entsprechend zusammengestellten Apparat aufzubauen und dem speziellen Bedarf des Einzelversuches anzupassen.

Für meine Zwecke erwies es sich als zweckmäßig, behufs Bindung der verdampfenden salpetrigen Säure noch eine kleine mit Kaliumpermanganat

Zwei Bestimmungen mit 0,2399 g und 0,3683 g der Curtiusschen Base stellte ich an, ohne zu erwärmen. Dabei wurde kein Stickstoff abgespalten. Versuche, bei denen die Reaktion unter Erhitzen auf dem Wasserbade vorgenommen wurde, ergaben allen Stickstoff in Gasform. Des hohen Stickstoffgehaltes des Präparates wegen kamen relativ kleine Substanzmengen zur Verwendung.

1. 0,0694 g Substanz liefern 25,8 ccm N bei 762 mm und 17° C.
2. 0,0654 g Substanz liefern 24,7 ccm N bei 760 mm und 16° C.

Berechnet:	Gefunden:
N = 22,02 Proz.	1. 21,93 Proz.
	2. 22,30 „

Die Curtiussche Base gestattet somit nicht eine getrennte Bestimmung der basischen NH_2-Gruppe auf diesem Wege. Sie spaltet dabei wie die ähnlich gebaute Hippursäure auch den Stickstoff der NHCO-Gruppen ab.

Trypsinspaltung der Biuretbase. Da die Biuretbase eine sehr intensive Reaktion mit Natronlauge und Kupfersulfat gibt, so war sie, wie keine der anderen ähnlichen Verbindungen, geeignet, vermittelst dieser Reaktion auf ihre Spaltbarkeit durch Trypsin untersucht zu werden.

0,1 g des Körpers wurden mit 5 ccm einer Trypsinlösung B versetzt (Probe 1). Zur Kontrolle wurden gleichzeitig folgende Proben hergestellt: a) 0,1 g Biuretbase + 5 ccm gekochten Trypsins (Probe 2), b) 0,1 g in Wasser gelöster Base + 0,2 proz. Na_2CO_3-Lösung (Probe 3), c) 0,1 g in Wasser gelöster Biuretbase (Probe 4). Die Biuretreaktion war nun

	in Probe 1	2	3	4
nach 2 Tagen	noch vorhanden	sehr stark	sehr stark	sehr stark
„ 4 „	überaus schwach, fast nicht bemerkbar	„ „	„ „	„ „
„ 6 „	vollstdg. verschwunden	„ „	„ „	„ „
„ 10 „	„ „	„ „	„ „	„ „

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß das Trypsin die Fähigkeit besitzt, die Curtiussche Base bis zum völligen Verschwinden der Biuretreaktion zu verändern. Bei gleichen Mengenverhältnissen war regelmäßig in meinen zahlreich angestellten Versuchen genau am 4. bis 5. Tage die Reaktion verschwunden.

Interessant war es, zu vergleichen, ob auch Pepsinsalzsäure ein Verschwinden der Biuretreaktion zustande bringe. Indessen gelangte ich hier zu einem negativen Resultat.

---

gefüllte Waschflasche einzuschalten. Die Durchströmung des Apparates mit Kohlensäure erzielte auch ich nach den Angaben von H. Meyer mit dem von F. Blau (Monatshefte für Chemie 13, 279) angegebenen Verfahren, das auf dem leicht zu beherrschenden Eintropfen einer in einem Tropftrichter befindlichen konzentrierten Pottaschelösung in vorgelegte 50 proz. Schwefelsäure beruht.

Versuch 1: Ein nach der Glaessnerschen Methode*) dargestelltes Pepsinpräparat wird mit Salzsäure und einer kleinen Menge der Base zusammengebracht. Nach 3 Wochen ist die Biuretreaktion noch sehr stark, nach 9 Wochen erhält man zwar nicht mehr die rote Farbe, die die Base gewöhnlich gibt, wohl aber eine stark blauviolette. Die Abnahme nach dieser langen Zeit kann ich nicht auf eine Spaltung durch das Ferment beziehen, da die gleiche Menge der Biuretbase, in Wasser gelöst und über 6 Wochen lang im Brutschrank aufbewahrt, ebenfalls an Intensität der Reaktion verlor.

Versuch 2. Es wurde ein käufliches Pepsinpräparat benutzt, das die Biuretreaktion so schwach zeigte, daß diese jener der Glycinbase gegenüber vernachlässigt werden konnte. Die Fermentlösung zeigte starke Verdauungskraft. Die eine größere Menge der Biuretbase enthaltende Probe zeigte noch nach 5 Monaten eine ebenso starke Biuretreaktion wie vorher.

Um nun weiter zu erfahren, in welcher Weise die Curtiussche Base durch Trypsin abgebaut wird, wurden 2 g der Biuretbase mit 15 ccm der Trypsinlösung B unter Toluol der Digestion unterworfen. Nach Verschwinden der Biuretreaktion — eine Probe, die 2 g der Biuretbase in Wasser gelöst enthielt und gleich lang wie die Hauptprobe digeriert worden war, zeigte noch intensive Biuretreaktion — wurde filtriert, das Filtrat unter vermindertem Druck bis auf ein geringes Volumen eingedampft und dann Alkohol zugesetzt, bis die entstehende Trübung nicht mehr verschwand. Es trat reichliche Kristallisation auf. Das erhaltene Produkt wurde durch Lösen in heißem Wasser und nachheriges Ausfällen mit absolutem Alkohol unter Zuhilfenahme von Tierkohle zweimal umkristallisiert. Der Körper ist von süßem Geschmack, in kaltem Wasser ziemlich, in heißem gut löslich, in Alkohol unlöslich. Mit Eisenchlorid gibt er tiefrote Färbung, mit Kupferkarbonat blaue Lösung. Bei dem freiwilligen Verdunsten der durch Kochen mit Kupferkarbonat erhaltenen Lösung kristallisieren blaue Nadeln aus. Eine Schmelzpunktsbestimmung ergab, daß der Körper bei 218° sich dunkler färbte, bei 228° braun wurde und bei 233° unter Gasentwickelung zu schmelzen begann. Dieses Verhalten stimmt mit den von Curtius**) für das Glykokoll gemachten Angaben überein.

0,1300 g über Schwefelsäure getrockneter Substanz neutralisierten bei Bestimmung nach Kjeldahl 17,95 ccm $^1/_{10}$ Norm.-NaOH.

Berechnet für CH_2NH_2COOH	Gefunden
N = 18,67 Proz.	19,33 Proz.

*) Diese Beiträge 1, 1.

**) Journal f. prakt. Chemie 26, 156.

Aus diesen Daten ergibt sich, wenngleich das Ergebnis der Stickstoffbestimmung zu hoch ausfiel, doch ohne Zweifel, daß sich bei der Einwirkung des Trypsins auf die Curtiussche Base Glykokoll zurückbildet.

III. Schlußbemerkungen.

Stellen wir die Ergebnisse der Versuche, wie sie oben mitgeteilt wurden, zusammen, so fällt zunächst auf, daß die Amide — Asparagin, Acetamid, Harnstoff, Benzamid, Oxamid, Biuret, Malondiamid, Glycinamid, Äthyloxamid, Monophenyloxamid — durch Trypsin nicht zerlegt werden. Man hätte um so eher auf eine Aufspaltung dieser Körper rechnen können, als doch Mochizuki*) gezeigt hat, daß bei der Trypsinwirkung auf Eiweißstoffe fast genau jener Teil des Stickstoffs, welcher sich als durch Säure angreifbar erweist, auch für das Trypsin abspaltbar ist. Ebenso kamen Dzierzgowski und Salaskin**) zu dem Resultate, daß „bei der Einwirkung des Pankreassaftes ein Teil des Eiweißstickstoffes abgespalten wird, welcher offenbar in den Eiweißkörpern in der leicht abspaltbaren Form des ‚Amidstickstoffes' vorhanden ist".

Zu demselben negativen Resultate bezüglich der Wirkung des Trypsins auf Amide kam auch Gonnermann***) in einer Juli 1902 nach Abschluß meiner einschlägigen Versuche erschienenen Arbeit. Die Amide die er untersuchte, es sind zum Teil dieselben die auch ich prüfte: Formamid, Oxamid, Succinamid, Benzamid, Salicylamid, erwiesen sich als unangreifbar für das Trypsin. Nur bei der Einwirkung des letzteren auf Acetamid erhielt er ein positives Resultat und hält in einer jüngst erschienenen Arbeit†), in der er Bezug nimmt auf die von Hofmeister††) (September 1902) erwähnten Resultate der vorliegenden Untersuchungen, an seinen Angaben fest. Ich kann im Hinblick auf die überaus einfache, von mir angewandte Methodik und die völlig gleichlautenden Resultate nur vermuten, daß Gonnermanns mehr indirektes Verfahren mit einer Fehlerquelle behaftet war.

An dieser Stelle möchte ich auch auf die eingangs erwähnte Versuchsreihe von Gulewitsch*†) eingehen, welche es möglich erscheinen ließ, daß Trypsin Acetyl aus acetylierten Aminen abspaltet, was ja ein Seitenstück zu der eben beschriebenen Auf-

*) Diese Beiträge **1**, 44.
) Centralblatt f. Physiologie **15, 249.
***) Pflügers Archiv **89**, 493.
†) Pflügers Archiv **95**, 278.
††) loc. cit.
*†) Zeitschr. f. physiol. Chemie **27**, 540.

spaltung der Curtiusschen Base darstellen würde. In 6 Versuchen mit p-Diacetylamidophenol $(CH_3CO)OC_6H_4NH(COCH_3)$ erhielt er den mit Trypsin digerierten Proben konstant ein Plus an Essigsäure gegenüber den mit gekochter Trypsinlösung angestellten Versuchen. Er spricht sich jedoch über diese Versuche mit aller Reserve aus.

Die von Gulewitsch bis ins kleinste Detail gegebene Anordnung erleichterte mir die Nachprüfung außerordentlich. Ich hielt mich streng an seine Angaben. Es ergab sich, daß, wenn die Kontrollproben unter genau gleichen Bedingungen (speziell mit Sodazusatz) angestellt wurden, ein Unterschied in der Größe der Essigsäureabspaltung nicht erweislich war. In der beifolgenden Tabelle habe ich die von Gulewitsch benutzte Bezeichnung beibehalten und als D die Menge der $^1/_{10}$ Norm.-NaOH in Zentimetern bezeichnet, die zur Neutralisation derjenigen Essigsäuremenge notwendig war, welche in einer nur mit Soda digerierten Probe abgespalten wurde.

Menge der Subst.	Menge des Trypsins A und der Sodalösung	Dauer der Dig.	S	A	D
0,5 g	0,5 g in 100 ccm Soda	12 Tage	9,3	—	—
0,5 g	0,5 g gekocht in 100 ccm „	12 „	—	6,0	—
0,5 g	— 100 ccm „	12 „	—	—	10,75

Wie man sieht, wirkt die zugesetzte Sodalösung stärker spaltend als die daneben Trypsin enthaltende, ungekochte, ganz besonders stärker aber als die gekochte Probe. Die Deutung dieses Verhaltens ist wohl darin zu suchen, daß das Alkali durch die dem Trypsinpräparat anhaftenden Stoffe langsam beim Stehen, rasch beim Kochen (vielleicht durch Bildung von Albuminat) an Wirksamkeit einbüßt.

Wenn es mir somit wider Erwarten in den angeführten Fällen nicht gelang, die Spaltung einer säureamidartigen Verbindung zu erzielen, ist der mit der Curtiusschen Base erhaltene positive Befund um so bemerkenswerter. Sein Hauptinteresse liegt darin, daß diese Base einen Bau besitzt, welcher, wie Hofmeister*) zuerst ausführlich begründet hat, den Eiweißkörpern und deren Abkömmlingen zukommt. Wenn einerseits daher gezeigt wurde, daß das Verhalten der Eiweißkörper und der Abkömmlinge derselben auf Grund der Beobachtungen von Curtius und namentlich E. Fischer auf eine säureamidartige Bindung hinweist, daß andererseits das verbreitete Vorkommen analoger Synthesen im Tier- und Pflanzenreich diese Vermutung in höchstem Grade unterstützt, so ist nun durch meine Versuche weiter der Nachweis erbracht, daß die künstlich erhaltenen Produkte von solchem Bau, wie ihn die Curtiussche Base aufweist, einer Spaltung durch tryptisches, Eiweißkörper verdauendes Ferment unter Verhältnissen zugänglich

*) loc. cit.

sind, die durchaus den im Tierkörper gegebenen entsprechen. Es zeigt dies, daß die Bindungsweise $NH . CH_2 . CO . NH$, welche Hofmeister als besonders charakteristisch für die Proteinstoffe ansieht, im gegebenen Fall zugleich den Angriffspunkt der Wirkung des tryptischen Fermentes darstellt. Dabei ist es bemerkenswert, daß der Curtiussche Körper der Fermentwirkung zugänglich ist, obgleich er kein asymmetrisches C-Atom enthält, und daß sein Verhalten sich trotzdem als ein spezifisches darstellt, da einerseits andere Stoffe, welche die gleiche Gruppe enthalten, z. B. das Glycinamid, der Trypsinwirkung widerstehen, andererseits die Curtiussche Base selbst der analogen Einwirkung von Pepsinsalzsäure unzugänglich ist.

Es ist wohl zu hoffen, daß eine Weiterführung solcher Versuche sowohl an natürlichen Spaltungsprodukten als auch an ähnlich gebauten synthetisch erhaltenen Stoffen zur Klarstellung jener Struktureigentümlichkeiten führen wird, welche dem Trypsin seine spaltende Wirkung ermöglichen.

XIII.

Tryptophan, eine Vorstufe des Indols bei der Eiweißfäulnis.

Vorläufige Mitteilung

von **Alexander Ellinger** und cand. med. **Max Gentzen.**

(Aus dem Universitäts-Laboratorium für medizinische Chemie und experimentelle Pharmakologie zu Königsberg in Pr.)

Für nahezu alle wohl charakterisierten Produkte, welche bei der Fäulnis von Eiweißkörpern erhalten worden sind, ist teils durch die älteren Untersuchungen von Nencki, Brieger, E. und H. Salkowski, Baumann und deren Schülern, teils durch Untersuchungen der letzten Jahre der Weg gezeigt worden, auf welchem sie durch verschiedene Zwischenstufen hindurch aus der komplexen Eiweißmolekel entstehen. Nur für zwei der am längsten bekannten Fäulnisprodukte, das Indol und Skatol, sind wir hinsichtlich ihrer Entstehung fast ausschließlich auf Hypothesen angewiesen. So hat Nencki*) die Vermutung ausgesprochen, daß alle bei der Fäulnis beobachteten Körper der Indolgruppe, das Indol, Skatol, die Skatolkarbonsäure und Skatolessigsäure einer gemeinsamen Muttersubstanz, der damals unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Proteine noch nicht aufgefundenen Skatolaminoessigsäure entstammten.

Die Frage nach der Entstehung des Indols aus Eiweiß trat in ein neues Stadium, als Hopkins und Cole**) die Reindarstellung des Tryptophan gelang, welche bis dahin trotz aller Bemühungen vergeblich versucht war. Dieser Körper, der von seinem regelmäßigen Auftreten bei der tryptischen Verdauung seinen Namen erhalten hat, und dessen Entstehung bei der Eiweißfäulnis auf Grund seiner charakteristischen Reaktionen längst erkannt war, ergab bei der Analyse Zahlen, welche auf

---

*) Monatshefte f. Chemie **10**, 506 (1889).

) Journal of physiology **27, 418 (1901).

eine Skatolaminoessigsäure oder Indolaminopropionsäure stimmten, und seine Reaktionen wiesen darauf hin, daß ein Indolkern in ihm enthalten sei.

Diese in der Arbeit der beiden englischen Forscher sichergestellten Tatsachen luden zur Prüfung der Frage ein, ob in dem Tryptophan eine oder die Vorstufe des Indols bei der bakteriellen Eiweißzersetzung vorliege, und weiterhin ob der Organismus der höheren Tiere aus Tryptophan Indol bilden könne.

Für uns war namentlich das letztere Problem mit Rücksicht auf den derzeitigen Stand der Indicanfrage von Interesse. In mehreren Arbeiten, welche aus dem hiesigen Institute im Laufe des letzten Jahres veröffentlicht worden sind [Scholz*), Ellinger**)], ist der von mehreren Autoren, am energischsten von Blumenthal und seinen Mitarbeitern Lewin***) und Rosenfeld†) verfochtenen Behauptung entgegengetreten worden, es lägen bisher irgend welche Beweise dafür vor, daß das Harnindican eine andere Quelle habe als das durch bakterielle Zersetzung innerhalb oder außerhalb des Darmkanals entstandene Indol. Die Möglichkeit, daß Indol auch im intermediären Stoffwechsel beim Abbau der Eiweißkörper entstehen könne, ließ sich natürlich nicht in Abrede stellen, und falls sie im Tierkörper verwirklicht war, so lag es am nächsten, anzunehmen, daß das Tryptophan, zu dessen Entstehung durch tryptische Fermente im Organismus ja reichlich Gelegenheit vorhanden ist, Quelle des Indols bezw. des Harnindicans sei††).

Vier Versuche, die wir an Kaninchen, und einer, welchen wir an einem kleinen Hunde anstellten, ergaben, daß das nach Hopkins und Cole rein dargestellte Tryptophan weder bei subcutaner Injektion noch nach Darreichung per os Ausscheidung von Indican veranlaßte. Die vorher indicanfreien Tiere blieben bei Aufnahme von je 0,2 g des Körpers indicanfrei. Damit erscheint uns die Annahme, daß Indol beim Abbau von Eiweißkörpern durch die Zwischenstufe des Tryptophans hindurch

*) Beiträge zur Frage nach der Entstehung des Indicans im Tierkörper. Inaug.-Diss. Königsberg 1903.

**) Die Indolbildung und Indicanausscheidung beim hungernden Kaninchen. Ztschr. f. physiol. Chemie, im Druck.

***) Diese Beiträge 1, 472 (1902).

†) Charité-Annalen 1903. Jahrg. 27.

††) Als unsere Untersuchungen bereits im Gange waren, ist auch von Blumenthal und Rosenfeld in einer im April erschienenen Abhandlung (Charité-Annalen, Jahrgang 27) die Vermutung ausgesprochen worden, daß Tryptophan eine Vorstufe des Indicans sei.

im Organismus des Kaninchens oder Hundes entstehe, widerlegt.

Ob beim bakteriellen Abbau der Eiweißkörper Indol aus Tryptophan entsteht, darüber konnten uns diese Versuche nichts sagen. Denn selbst bei der Verabreichung per os ließ sich erwarten, daß das Tryptophan früher resorbiert würde, als es in den Dickdarm, die Stätte der normalen Darmfäulnis, gelangt. Aber auch diese Frage konnten wir entscheiden, indem wir den kleinen Kunstgriff benutzten, das Tryptophan in schwacher Sodalösung direkt mit einer Pravazschen Spritze in den Blinddarm des Kaninchens zu injizieren. Durch Kontrollversuche überzeugten wir uns, daß der operative Eingriff, unter aseptischen Kautelen ohne Einfluß auf die Indicanausscheidung blieb, wenn die gleiche Menge Sodalösung ohne Tryptophan injiziert wurde. Ein Kaninchen schied unter diesen Umständen am Injektionstage 1 mg Indican (als Indigo berechnet) aus, ein anderes blieb dauernd indicanfrei.

Dagegen verhielt sich bei zwei vorher indicanfreien Kaninchen die Ausscheidung nach Injektion von 0,2 g Tryptophan in das Coecum, wie folgt:

Kaninchen I (Gewicht 2080 g) liefert am ersten Tage 21,2 mg, am zweiten Tage 16,35 mg Indigo, vom dritten Tage an ist es wieder indicanfrei.

Kaninchen II (Gewicht 1700 g) schied am ersten Tage 20,1 mg Indigo aus, und war am 2. Tage schon indicanfrei.

Das erste Kaninchen zeigte nach der Operation etwas verminderte Freßlust, doch liegt kein Grund vor, einen nennenswerten Anteil der Indicanausscheidung diesem Umstand zuzuschreiben, da bei den Kontrolltieren dasselbe beobachtet wurde, ohne daß die Indicanausscheidung höher als auf 1 mg stieg. Sonst blieb der Eingriff ohne erkennbare Folgen.

Die Indigomenge, die im ersten Versuch erhalten wurde, betrug also 37,55 mg, im zweiten 20,1 mg. Nach den Versuchen von Ellinger*) über die titrimetrische Indicanbestimmung im Harn muß zu diesen Werten $^1/_6$ der gefundenen Menge als Korrektur addiert werden; danach entsprechen der ausgeschiedenen Indicanmenge bei Kaninchen I 43,8 mg, bei Kaninchen II 23,5 mg Indigo. Aus 0,2 g Tryptophan können, vorausgesetzt, daß daraus Indol abgespalten und dieses zu Indigo oxydiert wird, 128,4 mg Indigo entstehen. Somit fanden sich 34,11 Proz. bezw. 18,3 Proz. der theoretischen Menge Indigo im Harn.

Nun werden aber von eingegebenem Indol, beim Hunde wenigstens, nach Untersuchungen von Wang**) und eigenen Er-

*) Ztschr. f. physiolog. Chemie 38, 178 (1903).

**) Ztschr. f. physiolog. Chemie 27, 557 (1899).

fahrungen im besten Falle nur etwa 60 Proz. als Indican ausgeschieden bezw. als Indigo bestimmt. Wir müssen also die im Dickdarm des Kaninchens aus Tryptophan entstandene Menge Indol etwa doppelt so hoch schätzen als die gefundene Indigomenge, wobei die Annahme gemacht ist, daß die Ausscheidungsverhältnisse für Indol beim Hunde und Kaninchen ungefähr gleich sind, und daß das als Indican ausgeschiedene Material im Darm als Indol resorbiert wurde*).

Die Feststellung einer so weitgehenden Indolbildung aus Tryptophan im Dickdarm berechtigt wohl zu dem Schlusse, daß das Tryptophan eine, wenn nicht gar die Vorstufe des Indols bei der bakteriellen Eiweißzersetzung ist.

Eine Rötung des Harns bei der Indicanprobe, die auf Ausscheidung von Skatolfarbstoff hingewiesen hätte, konnten wir in keinem unserer Versuche beobachten. Das Fehlen des Skatolfarbstoffs im Harn bei der sehr reichlichen Ausscheidung von Indican scheint uns eher dafür zu sprechen, daß das Tryptophan sich vom Indol, als daß es sich vom Skatol ableitet.

Doch lag die Frage nach der Konstitution des Tryptophans zunächst nicht in unserem Arbeitsprogramm, und wir haben Versuche über die Zersetzung von Tryptophanlösungen durch Reinkulturen von Bakterien vorerst zurückgestellt, da, wie wir einer freundlichen schriftlichen Mitteilung des Herrn Hopkins entnehmen, dieser selbst mit Herrn Cole zusammen die bakterielle Zersetzung des Tryptophans studiert hat, um Aufschlüsse über die Konstitution dieses Körpers zu erhalten, und demnächst darüber berichten wird.

Königsberg i. Pr., 1. Juni 1903.

---

*) Wir haben uns davon überzeugt, daß nicht etwa Tryptophan selbst bei Behandlung mit Obermayers Reagens Indigo liefert.

XIV.

Über die Darstellung der Guanylsäure.

Von **Ivar Bang** und **C. A. Raaschou.**

(Aus dem physiol.-chemischen Laboratorium zu Lund, Schweden.)

Vor einigen Jahren hat der eine von uns gezeigt, daß man aus dem Pankreas eine Nucleinsäure, die Guanylsäure, darstellen kann, welche einen Bestandteil des Pankreas-Nucleoproteids von Hammarsten darstellt*).

Die Guanylsäure hat in doppelter Beziehung ein Interesse. Einmal enthält sie von Purinbasen nur eine, das Guanin, sodann enthält sie Pentose. In der letzten Zeit hat Neuberg**) nachgewiesen, daß die Pentose der Pankreasdrüse l-Xylose ist und schließt hieraus, daß jene der Guanylsäure wahrscheinlich dieselbe Pentose ist. Doch hat weder Neuberg noch ein anderer Forscher die Guanylsäure nach dieser Richtung untersucht.

Mit gutem Grund wurde allerseits hervorgehoben, daß die Darstellung der Guanylsäure außerordentlich schwierig und namentlich die Ausbeute äußerst gering ist. Eine verbesserte Darstellungsmethode wäre daher sehr wünschenswert. Eine Arbeit von Umber***) schien auch eine solche in Aussicht zu stellen. Umber digerierte das Nucleoproteid mit Pepsin-Salzsäure. Bei der Neutralisation der Verdauungslösung schied sich die Guanylsäure aus. Der Phosphor-Gehalt betrug 8,45 Proz. Trypsindigestion des Nucleoproteides hatte dieselbe Wirkung.

Diese Methode ist jedoch ganz unsicher. Nach längerer Digestion erwies sich die Lösung als direkt reduzierend, und es ist demnach nicht unwahrscheinlich, daß dann ein Teil der Guanylsäure bereits gespalten war. Weiter konnte Umber die Guanylsäure teilweise mit Ammonsulfat aussalzen, was unseren Erfahrungen nicht entspricht. Zuletzt schlägt Umber den Guanyl-

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 26 und 31.

**) Berl. Berichte 35, 1467.

***) Zeitschr. f. klin. Medizin 43.

säurerest aus dem mit Ammonsulfat gesättigten Filtrate mittels Quecksilberacetat nieder.

Nach unseren Erfahrungen geht man am besten von Pankreas selbst aus. Der eine von uns*) hat versucht, die Methode Umbers auf Pankreas bezw. alkalische Dekokte von Pankreas anzuwenden. Man neutralisiert, sättigt mit Ammonsulfat, filtriert und schlägt die Guanylsäure mit Quecksilberacetat nieder. (Der durch Ammonsulfat erhaltene Eiweißniederschlag gibt keine Pentosenreaktion.) Die Quecksilberverbindung der Guanylsäure wird weiter mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat eingedampft und die Nucleinsäure mit Alkohol niedergeschlagen. Es zeigte sich aber, daß die Guanylsäure sehr empfindlich gegen Schwefelwasserstoff ist. Beim Eindampfen wurde sie größtenteils zerstört. Weiter wurde das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff nur unvollständig abgespalten. Wenn man Schwefelalkali benutzt, stellt sich die Sache nicht besser. Wir haben noch viele andere Metallsalze untersucht, haben jedoch zuletzt von ihrer Anwendung ganz Abstand genommen. Dagegen stimmen wir mit Umber darin überein, daß frisch dargestelltes Quecksilberacetat die Guanylsäure vollständig niederschlägt. Dasselbe tun übrigens mehrere Acetate, z. B. Bleiessig, welcher dem Quecksilberacetat vorzuziehen ist. Die Chloride und Sulfate der Schwermetalle fällen die Guanylsäure dagegen nur unvollständig.

Da die Ausfällung der Guanylsäure als Metallsalz nicht zum Ziele führte, haben wir die Versuche mit Erfolg in anderer Richtung weitergeführt. In einer in norwegischer Sprache erschienenen Mitteilung hat der eine von uns gezeigt, daß man durch Aufnehmen der Guanylsäure mit heißem 60-proz. Alkohol, worin sie ziemlich löslich ist, und Abkühlen des Filtrats beträchtliche Mengen derselben darstellen kann. Diese Methode haben wir in verschiedener Weise ausprobiert und sind zuletzt zu folgender Modifikation gelangt.

1000 bis 1200 g Ochsen-Pankreas werden in der Fleischhackmaschine zerkleinert, dann mit 2 Liter 1-proz. Natronlauge angerührt. Nach 24 Stunden erwärmt man die Mischung bis die Lösung dünnflüssig wird. Man neutralisiert mit Essigsäure und setzt davon zuletzt bis zur deutlich sauren Reaktion hinzu. Der entstandene zähe, schwarzbraune Niederschlag wird abkoliert und 1 bis 2 mal mit Wasser ausgekocht. Die gesamte kolierte Flüssigkeit (5 bis 6 Lit.) wird filtriert, mit Ammoniak zu schwach alkalischer Reaktion versetzt und auf etwa 300 ccm eingedampft. Jetzt versetzt man

---

*) Bang, Mindre Middelelser om Guanylsyren. Archiv f. Mathem. og Naturvidenskab **24**. (Norwegisch).

die noch heiße Lösung mit 3 Vol. Alkohol. Es entsteht ein reichlicher Niederschlag, während sich der Alkohol stark braun färbt. Nach einigen Stunden filtriert man. (Man kann auch gleich nach dem Erkalten filtrieren, das alkoholische Filtrat gibt dann aber eine Nachfällung, die man zweckmäßiger mitverarbeitet.) Der Niederschlag wird in 150 ccm Wasser gelöst und heiß filtriert. Den unlöslichen Rest kocht man einmal mit Wasser aus, vereinigt die Filtrate und setzt nach Abkühlung 3 Vol. Alkohol hinzu. Es entsteht sogleich ein voluminöser, reichlicher Niederschlag, welcher aus schon ziemlich reiner Guanylsäure besteht. Er wird abfiltriert und nochmals in 100 ccm heißem Wasser gelöst. Man filtriert heiß, läßt abkühlen, setzt 3 Vol. Alkohol hinzu, filtriert, wäscht mit Alkohol aus und erhält zuletzt nach Alkohol-Äther-Behandlung die Guanylsäure als ein weißes, feines Pulver.

Zu dieser Darstellungsmethode ist folgendes zu bemerken:

1. Man benutzt nur 1-proz. Natronlauge (während man sonst zur Darstellung der Guanylsäure aus Pankreasproteid 2-proz. Kalilauge anwendet); ferner ist die Erhitzung der alkalischen Mischung so weit als möglich einzuschränken. Bei Verwendung stärkerer Lauge und bei längerer Erhitzung erhält man mit Alkohol schmierige, braune, sirupöse Massen, welche zwar eine intensive Pentosenreaktion geben, aber doch nur als Sirupe erhältlich sind.

2. Die Alkoholfällung liefert sehr rasch Präparate, welche absolut eiweißfrei (und salzfrei) sind. Die Eiweißkörper, welche nach der Alkalibehandlung entstehen, sind: 1. Alkalialbuminate, welche bei der Neutralisation ausfallen; 2. melaninartige Körper, welche größtenteils mit den Alkalialbuminaten ausfallen; 3. der größte Teil der Eiweißkörper sind albumosenartige Substanzen, welche in 70 bis 80-proz. Alkohol löslich sind. Die alkoholischen Extrakte geben deswegen auch eine intensive Biuretreaktion; 4. ein Teil der Eiweißkörper wird endlich durch den Alkohol koaguliert.

3. Die Säure selbst ist sehr leicht in Wasser löslich und wird bei Zusatz von Säuren — Essigsäure und Mineralsäuren — nicht gefällt. Da die gewöhnliche Guanylsäure nicht besonders wasserlöslich ist und auch von Essigsäure gefällt wird, kann unsere Säure nicht mit der Guanylsäure identisch sein.

Zur Sicherstellung des Unterschiedes haben wir uns bemüht, die elementare und rationelle Zusammensetzung unserer Präparate festzustellen.

Wir haben uns mit Phosphor- und Stickstoffanalysen begnügt und teilen die Resultate hier mit.

Präp. I. Phosphorbestimmung.

1. 0,2350 g bis 0,0560 g Pyrophosphat = 6,65 Proz. P.
2. 0,3385 „ „ 0,0793 „ „ = 6,54 „ P.

Präp. II. a) Phosphorbestimmungen.

1. 0,1946 g bis 0,0453 g Pyrophosphat = 6,50 Proz. P.
2. 0,2240 „ „ 0,0528 „ „ = 6,58 „ P.
3. 0,3350 „ „ 0,0802 „ „ = 6,70 „ P.

b) Stickstoffbestimmungen.

1. 0,1789 g bis 19,3 $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 = 15,10 Proz. N.
2. 0,2178 „ „ 23,9 „ „ = 15,36 „ N.
3. 0,4028 „ „ 44,2 „ „ = 15,38 „ N.

	P.	N.
Präp. I.	6,65 Proz.	—
	6,54 „	—
Präp. II.	6,50 „	15,10 Proz.
	6,58 „	15,36 „
	6,70 „	15,38 „
Mittel:	6,59 Proz. P.	15,28 Proz. N.
Auf aschefreie Substanz berechnet:	6,65 Proz. P.	15,38 Proz. N.

Diese Nucleinsäure enthielt also nur 6,65 Proz. Phosphor und 15,38 Proz. Stickstoff, während die Guanylsäure 7,64 Proz. P und 18,21 Proz. N aufweist.

Dabei lieferte sie reichlich Pentose und reduzierte Fehlingsche Lösung nach Inversion. Weiter konnten wir aus ihr beträchtliche Mengen Guanin darstellen und haben auch hier daneben keine andere Purinbase gefunden. Ebensowenig vermißten wir das Glycerin.

Die Bestimmung der Spaltungsprodukte gab uns näheren Einblick in diesen Unterschied.

Wir bestimmten den Pentosen- und den Guaningehalt, indem wir in der Methodik den früheren Spaltungsversuchen der Guanylsäure folgten. Die Ergebnisse beziehen sich auf Präparat II.

1. Reduktionsversuche.
   a) 0,2913 g mit 100 ccm 5-proz. H_2SO_4 zerkocht = 33,98 Proz. Pentose, als Dextrose bestimmt.
   b) 0,3560 g mit 180 ccm 5-proz. H_2SO_4 zerkocht = 34,15 Proz. Pentose.
2. Guaninbestimmungen.
   a) 0,3074 g bis 0,2290 g Silberverbindung = 30,00 Proz. Guanin
   b) 0,2972 „ „ 0,2150 „ „ = 29,25 „ „
   c) 0,2936 „ „ 0,2060 „ „ = 29,13 „ „

Unsere Nucleinsäure enthält somit 34,07 Proz. (34,3 auf aschefreie Substanz umgerechnet) Pentose und 29,46 Proz. (29,7) Guanin, während die Guanylsäure nur 30 Proz. Pentose und 35,74 Proz. Guanin enthält.

Die Bedeutung dieser Unterschiede läßt sich am besten verstehen, wenn man die früher entwickelte Formel der Guanylsäure betrachtet. Danach ist die Guanylsäure:

$$
\begin{array}{c}
OH \quad OH \\
\diagdown \diagup \\
C_5H_4N_5-O-P-O-C_3H_5(OH)\cdot C_5H_9O_5 \\
| \\
O \\
| \\
C_5H_4N_5-O-P-O-C_3H_5(OH)\cdot C_5H_9O_5 \\
\diagup \diagdown \\
O \quad O \\
\diagdown \diagup \\
C_5H_4N_5-O-P-O-C_3H_5(OH)\cdot C_5H_9O_5 \\
| \\
O \\
| \\
C_5H_4N_5-O-P-OH \\
\diagup \diagdown \\
OH \quad OH
\end{array}
$$

während sich unsere neue Nucleinsäure durch die Formel ausdrücken läßt:

$$
\begin{array}{c}
OH \quad OH \\
\diagdown \diagup \\
C_5H_4N_5-O-P-O-C_3H_5(OH)\cdot C_5H_9O_5 \\
| \\
O \\
| \\
C_5H_4N_5-O-P-O-C_3H_5(OH)\cdot C_5H_9O_5 \\
\diagup \diagdown \\
O \quad O \\
\diagdown \diagup \\
C_5H_4N_5-O-P-O-C_3H_5(OH)\cdot C_5H_9O_5 \\
| \\
O \\
| \\
C_5H_4N_5-O-P-O-C_3H_5(OH)\cdot C_5H_9O_5 \\
\diagup \diagdown \\
OH \quad OH
\end{array}
$$

Unsere Säure würde sich danach von der Guanylsäure dadurch unterscheiden, daß sie eine Glycerin-Pentosegruppe mehr als diese enthält.

Die Spaltung dieser Säure müßte nach folgendem Schema verlaufen:

$$C_{52}H_{80}N_{20}P_4O_{40} + 12\,H_2O = 4\,(C_5H_5N_5O + H_3PO_4 + C_3H_8O_3 + C_5H_{10}O_5).$$

Diese Formel verlangt einen Gehalt von 7,09 Proz. P und 15,88 Proz. N, während wir in der Tat 6,65 Proz. P und 15,38 Proz. N gefunden haben. Sie läßt weiter die Bildung von 34,5 Proz. Guanin und 34,32 Proz. Pentose erwarten; gefunden: 29,7 Proz. Guanin und 34,3 Proz. Pentose*).

*) Bestimmt als Traubenzucker. Die Xylose reduziert etwas stärker als Dextrose, und deswegen sind unsere Werte etwas zu reduzieren.

Daß wir etwa 4 Proz. zu wenig Guanin gefunden haben, darf nicht befremden. Aus der Guanylsäure hat der eine von uns auch immer etwa 4 Proz. weniger erhalten, als der theoretischen Menge entspricht.

Es liegt ferner nahe, anzunehmen, daß die früher beschriebene Guanylsäure, welche wir mit β-Guanylsäure bezeichnen wollen, aus der jetzt gefundenen Nucleinsäure, der α-Guanylsäure, herstammt. Man kann vermuten, daß die Alkalieinwirkung hier eine wesentliche Rolle spielt. Bei der Darstellung der α-Guanylsäure kommt nur eine Lauge von 0,3 bis 0,5 Proz. in Verwendung, während die β-Guanylsäure durch Kochen mit 2-proz. Kalilauge aus dem Nucleoproteide dargestellt ist.

Um diese Vermutung experimentell zu prüfen, haben wir die α-Guanylsäure eine Viertelstunde mit 2-proz. Kalilauge im Wasserbade gekocht. Die Säure wurde hierdurch merklich verändert: 1. Sie wurde jetzt für Essigsäure fällbar, 2. war viel weniger leicht im Wasser löslich und 3. enthielt mehr Phosphor:

1. 0,1845 g bis 0,0485 g Pyrophosphat = 7,32 Proz. P.
2. 0,1825 „ „ 0,0490 „ „ = 7,50 „ P.

Im Mittel also 7,40 Proz. P. Die β-Guanylsäure enthält 7,64 Proc. P.

Durch Kochen mit Alkali läßt sich somit die α-Guanylsäure in β-Guanylsäure überführen.

Selbstverständlich kann man auch annehmen, daß man bei fortgesetzter Alkalieinwirkung zu einer γ- und δ-Guanylsäure kommen kann, und dies ist auch in der Tat der Fall. Diese stellen aber schmierige Produkte dar, die sich nicht zur Analyse eignen.

4. Die wesentliche Bedeutung der Methode liegt in der außerordentlich zufriedenstellenden Ausbeute. Während man nach der älteren Methode mit dem Nucleoproteid als Ausgangsmaterial etwa 0,1 g β-Guanylsäure aus einem Kilogramm Pankreas erhielt, haben wir daraus durchschnittlich 3 g ganz reine α-Guanylsäure erhalten. (Auf Trockensubstanz umgerechnet etwa 15 g pro kg.) Bei quantitativem Arbeiten erhält man wahrscheinlich noch etwas mehr. Übrigens scheint es, als ob das Pankreas recht verschiedene Mengen Guanylsäure enthalten könnte — von 2 bis 3,5 g pro kg Drüse.

5. Endlich bleibt noch zu untersuchen, ob die Guanylsäure die gesamte Pentose der Pankreasdrüse enthält, oder ob hier noch andere pentosenhaltige Substanzen vorhanden sind. Nach Grund*) enthält Pankreas 0,45 Proz. Pentose — aus dem Furfurol-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 35, 130.

niederschlage berechnet — was etwa 1,4 Proz. Guanylsäure entspräche. Bei unserer Methode würde man also nur $^1/_4$ der vorgebildeten Guanylsäuremenge erhalten.

Demgegenüber können wir mit Bestimmtheit behaupten, daß wir den bei weitem größten Teil der Guanylsäure gewonnen haben. Man muß somit entweder annehmen, daß ein Teil der Guanylsäure bei der Alkalibehandlung gespalten und zerstört wird, oder aber es muß die Pentose hauptsächlich in anderer Verbindung vorkommen. Da die Alkalibehandlung bei unserer Darstellungsweise so kurz dauert und der Alkaligehalt so gering ist, hat die erstere Annahme nicht besonders viel für sich. Auf der anderen Seite kann man leicht zeigen, daß die Pentose nicht als solche präformiert im Pankreas vorkommt. Beim Kochen mit Wasser kann man die Pentosenverbindungen ganz vollständig extrahieren. Versetzt man die Dekokte mit Bleiessig, so gibt das Filtrat absolut keine Pentosenreaktion mehr. Man kann somit schließen, daß präformierte Pentose nicht vorliegt.

Entweder enthält daher das Pankreas neben Guanylsäure andere pentosenhaltige Verbindungen, oder es kommen hier noch andere Substanzen vor, welche Furfurolbildung veranlassen. Nach unserer Ansicht ist die letztere Möglichkeit die wahrscheinlichere.

Nach Umber enthält Pankreas etwa 1,7 Proz. α-Nucleoproteid mit 1,76 Proz. P. Dies entspricht 0,43 Proz. α-Guanylsäure, während wir 0,3 Proz. gefunden haben.

Nach unserer Methode lassen sich leicht große Mengen Guanylsäure gewinnen. Wir selbst haben über 100 g dargestellt. Man hat hier anscheinend ein bequemes Ausgangsmaterial zur Darstellung der Xylose. Bei Versuchen in dieser Richtung gelangten wir in der Tat zu kristallisierten Produkten, welche sich aber beim Umkristallisieren größtenteils veränderten. Wir haben deswegen dieses Problem nicht weiter verfolgt.

Kürzere Mitteilungen.

1. Wird der Muskelsaft durch Autolyse gebildet?

von **Sigval Schmidt-Nielsen** (Bergen, Norwegen).

(Aus dem medizinisch-chemischen Institute der Universität Upsala.)

In einer im vorigen Jahre veröffentlichten Arbeit teilt Vogel*) eine Reihe von Versuchen mit, wonach es ihm normalerweise nie gelungen ist, aus frisch geschlachtetem, kontraktionsfähigem und lebendem Muskelfleisch Muskelsaft durch Pressen zu gewinnen, trotzdem er sich einer hydraulischen Presse von 5 bis 10 Atmosphären (1770 kg) Druckkraft bediente.

Dagegen konnte er aus aufbewahrtem Fleisch mit der Dauer der Aufbewahrung stetig zunehmende Saftvolumina auspressen.

So erhielt er z. B.

im Laufe von	2 Stunden	nach dem Tode	keinen Saft,
„ „ „	4 „	„ „ „	einige Tropfen,
nach	10 „	„ „ „	10,7 Proz. Saft,
„	26 „	„ „ „	25,8 „ „ ,
„	5 Tagen	„ „ „	32 „ „ .

Trotz der stetig steigenden Saftmengen blieb doch der Stickstoff- bezw. Eiweißgehalt in den verschiedenen Portionen derselbe. Aus diesem Grunde erklärt Vogel die Saftbildung durch eine Verflüssigung des Muskeleiweißes, die ihrerseits das Resultat einer postmortalen Proteolyse sein soll.

Diese Beobachtungen von Vogel stimmen indessen nicht mit den von mir am Fischfleisch gewonnenen Erfahrungen überein. Bei meinen Untersuchungen von völlig frischem Fischfleisch ist es mir nämlich niemals schwierig gewesen, binnen wenigen Stunden nach dem Tode reichliche Saftmengen auszupressen.

Es könnte also vielleicht bezüglich des Muskelsaftes ein wesentlicher Unterschied zwischen Säugetieren und Fischen bestehen, und da dies nicht nur von dem größten theoretischen Interesse, sondern auch für die mich beschäftigende Autolyse des Fischfleisches sehr wichtig wäre, habe ich in Zusammenhang mit anderen Untersuchungen die Angabe Vogels etwas näher studiert.

Verhält es sich in der Tat so, daß sich aus dem Säugetierfleisch unmittelbar nach dem Tode kein Saft auspressen läßt, wohl aber später, so würde hieraus noch nicht folgen, daß man es hier mit irgend welchen enzymatischen Prozessen zu tun hätte.

*) R. Vogel, Untersuchungen über Muskelsaft. Deutsches Archiv für klin. Medizin. 1902.

Kühne*) und Halliburton**) haben nämlich gezeigt, daß man durch Gefrieren von noch nicht totenstarren Frosch- und Kaninchenmuskeln, Verreiben zu Muskelschnee, Auftauen und Pressen, Plasma gewinnen kann. Namentlich geht aus den Versuchen von Halliburton hervor, daß er aus Kaninchenfleisch sicher meßbare Quantitäten erhalten konnte, wenn er auch keine näheren Daten hierüber mitteilt.

Da es außer Zweifel steht, daß der unter solchen Umständen gewonnene Saft kein Produkt einer Autolyse sein kann, habe ich in erster Linie Versuche mit gefrorenen Muskeln angestellt.

Ich lasse hier als Beispiel zwei der hierher gehörenden Versuche folgen:

Versuch I. 2 Stunden nach dem Tode wurde der dem Schlachtochsen entnommene, beim Berühren sich noch kontrahierende Halsmuskel zum steifen Gefrieren, dann nach 6 Stunden in eine Handpresse gebracht. Außer dem Saft, der im Preßtuch zurückblieb, ließen sich binnen 45 Minuten auf je 100 g Fleisch 29 g Saft auspressen.

In Versuch II wurde ein Halsmuskel 3/4 Stunde nach dem Schlachten zum Gefrieren gebracht und nach 6 Stunden im starren Zustande in die Handpresse gebracht. In einer Stunde wurden 31 Proz., d. h. 31 g Saft auf je 100 g Fleisch erhalten.

In diesen beiden Fällen wurden also binnen 8 bis 9 Stunden mehr als 30 Proz. Saft, also viel größere Mengen als während derselben Zeit in Vogels Versuchen erhalten.

Hierbei ist indessen noch zu beachten, daß von der obigen Zeit nur 2 bis 3 Stunden vor dem Durchfrieren des Fleisches verflossen waren, und wenn der Muskelsaft durch enzymatische Prozesse gebildet sein sollte, müßte allem Anscheine nach die Proteolyse in dieser Zeit stattgefunden haben, es sei denn, daß man keine Proteolyse im gefrorenen Muskel annehmen wollte.

Gegen die obigen Versuche konnte indessen eingewendet werden, daß der Muskelsaft ursprünglich in das colloidale Substrat imbibiert sein und sich so verhalten könnte, wie eine gefrorene Stärke- oder Leimlösung, die, vor dem Gefrieren unfiltrierbar, nach dem Auftauen mit der größten Leichtigkeit reichliche Flüssigkeitsmengen abgibt.

Es war sonach auch notwendig, Versuche direkt an dem nicht gefrorenen Muskel vorzunehmen. Von diesen teile ich den folgenden mit:

In Versuch I mit dem Halsmuskel vom Rind wurden erhalten:

Nach 1 Stunde (davon 30 Min. in der Presse) 9 Proz. Saft
„ 2 Stunden („ 1 Std. 30 Min. in der Presse)
im ganzen 21,5 Proz. Saft
„ 3 „ („ 2 „ 30 „ in der Presse)
im ganzen 25,8 Proz. Saft.

In Versuch II, auch am Halsmuskel vom Rind angestellt, wurden erhalten:

Nach 3/4 Stunde (davon 10 Min. in der Presse) 7 Proz. Saft
„ 1 „ („ 25 „ „ „ „) 10 „ „

In Versuch III, angestellt an einem Halsmuskel vom Ochsen, sofort nach dem Schlachten entnommen:

Nach 3/4 Stunden (davon 10 Min. in der Presse) waren 8 Proz. Saft ausgepreßt.

---

*) W. Kühne, Untersuchungen über das Protoplasma. Leipzig 1864.
**) W. D. Halliburton, On muscle-plasma. Journal of Physiology. Vol. 8. 1887.

In diesen und mehreren ähnlichen Versuchen habe ich gleich im Anfange keine Schwierigkeiten gehabt, aus den noch warmen, völlig kontraktionsfähigen Muskeln reichliche Saftmengen auszupressen — ein Resultat, das in vollstem Widerspruch zu den von Vogel gemachten Beobachtungen steht. Eine Erklärung kann ich kaum geben. Es ist völlig ausgeschlossen, daß Vogel mit einem niedrigeren Drucke gearbeitet oder auch nicht lange genug gepreßt hat. Im Gegenteil. Während Vogel eine hydraulische Presse verwenden konnte, stand mir nur eine kleine Handpresse zur Verfügung. Der Widerspruch bleibt somit unaufgeklärt, da es wohl ausgeschlossen ist, daß Vogel die im Preßtuch zurückgehaltenen Flüssigkeitsmengen nicht mitgerechnet hat. Daß diese Mengen nicht zu vernachlässigen sind, geht aus einem mir vorliegenden Beispiele hervor, wo von 237 g Fleisch 16 g Saft in dem 39 g schweren Preßtuch zurückgehalten wurden, d. h. 6,7 Proz. Eine Vernachlässigung dieses Momentes müßte ja zu völlig falschen Werten führen. Deswegen habe ich auch bei den letzten Versuchen das Fleischstück einfach mit einer starken Schnur gebunden.

Nachdem ich diese Versuche abgeschlossen hatte, erschien eine Arbeit von O. v. Fürth*), woraus hervorgeht, daß es auch ihm unschwer gelungen ist, reichliche Saftmengen aus dem lebenden Säugetierfleisch auszupressen.

Schließlich möchte ich erwähnen, daß der von mir gewonnene Muskelsaft in Übereinstimmung mit den Beobachtungen v. Fürths niemals eine spontane Koagulation gezeigt hat.

---

*) O. v. Fürth, Über die Gerinnung der Muskeleiweißkörper u. s. w. Diese Beiträge 3, Heft 12.

Buchdruckerei A. W. Zickfeldt, Osterwieck/Harz.



Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

IV. Band. 5. und 6. Heft

(Ausgegeben August 1903)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1903

Inhalt des 5. und 6. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XV.

Über die Bestimmung des Fettgehaltes tierischer Flüssigkeiten nach Pflüger-Dormeyer.

Von Professor Dr. **Muneo Kumagawa**

und

Privatdozent **Kenzo Suto.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität zu Tokio.)

Seit Jahren mit Fettbestimmungen an tierischen Geweben beschäftigt, haben wir uns bemüht, das Verfahren von Dormeyer, welches auf der Aufschließung der Organe mit Pepsin-Salzsäure behufs nachheriger Extraktion des Fettes beruht, etwas zu vereinfachen. Über einen Teil dieser noch nicht zu Ende geführten Versuche erlauben wir uns nachstehend zu berichten.

Zur Fettextraktion bedienten wir uns eines neuen, bequemen und rasch arbeitenden Extraktionsapparates, dessen Konstruktion aus der umstehenden Zeichnung ersichtlich ist.

Der Extraktionszylinder faßt etwa 150 ccm. Er trägt ein weites Seitenrohr, welches zum Aufsteigen der Ätherdämpfe und zum Abfließen des kondensierten Äthers dient. Die konische Verlängerung des Zylinders ist in die Mündung des Siedekölbchens von ebenfalls etwa 150 ccm Inhalt eingeschliffen. Innerhalb und etwas oberhalb des Konus befindet sich das untere Ätherrückflußröhrchen mit seinem allmählich zugespitzten Ende. Dasselbe hat an seinem oberen und seitlichen Teil eine Öffnung, welche zum Aufsteigen des Ätherdampfes dient. Die obere Mündung des Extraktionszylinders wird von einem eingeschliffenen Glasstöpsel verschlossen, welcher eine Fortsetzung des daraufsitzenden Rückflußkühlers bildet. Der Glasstöpsel trägt innen das obere Ätherrückflußröhrchen mit einer Öffnung für den Durchtritt des Ätherdampfes. Ein langes schmales Rohr (der „Ätherinjektor"), welches bei der Extraktion in den Zylinder hineingebracht wird, bildet den wesentlichsten Teil des Apparates. Das untere Ende desselben ist zu einer unten abgeflachten Kugel aufgeblasen, die seitlich etwa in der Höhe des größten Kreises drei feine Öffnungen trägt. Das obere zylinderförmig erweiterte Ende des Ätherinjektors nimmt die untere Spitze des oberen Ätherrückflußröhrchens auf.

Der obere Teil des Extraktionszylinders ist von erheblicher Länge, damit der mit Substanz beladene Äther nicht bis zur Mündung hinaufsteigt, vor allem aber, damit der im Injektor in hoher Schicht befindliche Äther einen genügenden Druck ausüben kann. Infolge dieses Druckes tritt der Äther aus den Öffnungen der kugelförmigen Erweiterung in feinen Strahlen heraus, welche, an die Wand des Extraktionszylinders stoßend, in feine Tröpfchen zerfallen und nun, indem sie gleichmäßig durch die ganze Flüssigkeit verteilt aufsteigen, die zu extrahierende Substanz aufnehmen. Die Öffnungen müssen im Mittel einen Durchmesser von etwa 0,4 mm besitzen. Sie dürfen nicht größer als 0,45 mm und nicht kleiner als 0,35 mm sein, sonst träte der Äther in großen Blasen heraus, was die Wirksamkeit des Apparates vermindern würde. Geringe Abweichungen in der Größe der Öffnungen können übrigens durch die Temperatur des Wasserbades ausgeglichen werden. Je größer die Öffnungen sind, desto höher muß das Wasserbad temperiert sein (zwischen 55° und 70° C.).

Als Belege für die Brauchbarkeit des Apparates seien einige der von uns angestellten Versuche mitgeteilt.

1. Salizylsäure.

Bei Extraktion einer 0,1-proz. wässerigen Lösung reiner Salizylsäure wurden A direkt, B nach Zusatz von 1 ccm Salzsäure (von 10 Proz.) nachstehende Werte erhalten*):

Tabelle I.

	A ohne Säurezusatz				B mit Säurezusatz			
Salizylsäurelösung in ccm:	70	70	120	120	70	70	120	120
Darin enthalten Salizylsäure in g:	0,0687	0,0687	0,1178	0,1178	0,0687	0,0687	0,1178	0,1178
Dauer der Extraktion in Stunden:	5	5	5	5	5	5	5	5
Wiedergefunden in g:	0,0683	0,0673	0,1156	0,1157	0,0687	0,0686	0,1178	0,1179
Differenz in g:	−0,0004	−0,0014	−0,0022	−0,0021	0	−0,0001	0	+0,0001

Die Versuche der Reihe B lehren, daß eine fünfstündige Extraktion zur quantitativen Gewinnung der Salizylsäure genügte. Der Umstand, daß in der Reihe A ohne vorgängigen Säurezusatz eine kleine Menge der Bestimmung entging, wie auch aus der positiv ausfallenden Reaktion des Rückstands mit Eisenchlorid zu entnehmen war, kann eventuell nur auf Bindung dieses Anteils durch aus dem Glas in Lösung gegangenes Alkali bezogen werden. Für

*) Die Bestimmung der Salizylsäure geschah gewichtsanalytisch. Da sich dieselbe schon bei 50° etwas verflüchtigt — (5 g verloren in unseren Versuchen pro Stunde 0,2 mg), so wurde die Lösung nach Verjagen des Äthers nur eine Stunde bei 50°, dann im Vakuum über Chlorkalzium getrocknet.

die exakte Extraktion saurer Stoffe ist somit ein entsprechendes Ansäuern von Wichtigkeit, auch wenn anscheinend die betreffende Säure in freiem Zustande vorliegt.

2. Koffein.

Hier erwies sich zehnstündiges Extrahieren zur Erschöpfung der 0,1-proz. Koffeinlösung als notwendig.

Tabelle II.

Koffeinlösung in ccm:	70	70	70	70
Enthaltend Koffein g:	0,0699	0,0699	0,0700	0,0700
Dauer der Extraktion in Stunden:	5	5	10	10
Wiedergefunden g:	0,0668	0,0650	0,0707	0,0695
Differenz:	—0,0031	—0,0049	+0,0007	—0,0005

3. Von tierischen Flüssigkeiten haben wir Milch, Blutserum und Ascitesflüssigkeit mit dem Apparate auf ihren Fettgehalt untersucht und dabei sehr befriedigende Resultate erhalten. Nur muß man bei allen Flüssigkeiten, welche Eiweiß gelöst enthalten und daher beim Schütteln mit Äther dicke Emulsionen bilden, eine kurzdauernde Verdauung mit Pepsinsalzsäure vorausgehen lassen. Die nachfolgende Extraktion verläuft dann ohne Emulsionsbildung stets sehr glatt.

Wir gehen hier nur auf die Milchfettbestimmungen etwas näher ein, da sich das dabei eingehaltene Verfahren mit wenigen Abänderungen auf fast alle tierischen Flüssigkeiten anwenden läßt.

10 ccm bzw. 10 g Milch werden mit 40 ccm Salzsäure von 0,5 Proz. und 50 ccm frisch bereiteter Pepsinsalzsäure (siehe unten) versetzt, zwei bis fünf Stunden bei 40° C. digeriert, dann in beschriebener Weise mit Äther extrahiert. Nach etwa fünf Stunden ist die ursprünglich weiße Mischung fast vollkommen klar geworden. Nur an der Berührungsfläche der Flüssigkeit mit dem Äther findet sich eine zarte, flockige Ausscheidung, die jedoch die Extraktion durchaus nicht beeinträchtigt. Nach zehn Stunden andauernder Extraktion wird der Äther verdunstet, dann der Rückstand kurze Zeit bei 50° C. getrocknet, nach dem Erkalten neuerlich mit absolutem Äther aufgenommen und die Lösung durch ein Asbestfilter*) in ein gewogenes Bechergläschen filtriert. Nach Verdunsten des Äthers kurz dauerndes Trocknen erst bei 50° C., sodann im Vakuum über Chlorkalzium, bis zum konstanten Gewichte.

$\frac{1}{5}$ n. Gr.

*) Eine ätherische Lösung, welche trotz wiederholten Abfiltrierens durch Papier trüb bleibt, wird bei Benutzung des Asbestfilters sofort klar. Wir

Das Resultat unserer Fettanalysen in der Milch haben wir durch Vergleichsbestimmungen nach Ritthausen*), Schmid-Bondzyński**) und Gerber***) an ein und derselben Kuhmilch kontrolliert.

Tabelle III.

Die Bestimmungen nach Ritthausen (A), Schmid-Bondzyński (B) und nach unserem Verfahren (D) wurden an 10 ccm Milch ausgeführt und auf 100 ccm umgerechnet. Extraktionsdauer bei A und D im ganzen zehn Stunden.

		A Ritthausen g in 100 ccm	B Schmid-Bondzyński g in 100 ccm	C Gerber bei 60° C. abgelesen %	D Kumagawa und Suto g in 100 ccm
Milch No. I (spez. Gew. 1,0298 bei 17,5° C.)	1	6,282	6,2814	6,30	6,477
	2	6,272	6,2997	6,30	6,513
	3			6,25	
Mittel		6,277	6,2905	6,283	6,495
Milch No. II (spez. Gew. 1,0312 bei 18° C.)	1	4,651	4,670	4,60	4,794
	2	4,634	4,555	4,53	4,809
	3			4,60	
Mittel		4,6425	4,6125	4,580	4,802

Um die Menge der bei unserer Methode etwa mitextrahierten Milchsäure festzustellen, wurde das Extrakt 2 von Milch No. II mit etwa 50 ccm warmer $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge versetzt und behufs Entfernung des Neutralfettes neuerdings extrahiert. Nach 15stündiger Extraktion wurde der Äther gewechselt und nach Zusatz von 10 ccm Salzsäure (von 10 Proz.) die Behandlung mit Äther weitere 20 Stunden fortgesetzt. Das zweite Extrakt, welches anscheinend ein Gemisch von Fettsäuren und Milchsäure darstellte und 0,0052 g wog, wurde mit Zinkkarbonat aufgekocht. Das eingeengte Filtrat und Waschwasser hinterließ im Exsikkator einen amorphen Rückstand im Gewicht von 0,0014 g (Zinklaktat?).

haben es bei Fettbestimmungen seit Jahren unentbehrlich gefunden. Wir benutzen einen gewöhnlichen Glastrichter mit einem langen, ganz engen Abflußrohr, das an der Verbindungsstelle mit dem Konus des Trichters etwas zylinderförmig erweitert ist. Diese Erweiterung dient zur Aufnahme eines Asbestpfropfens, welcher vorher durch Auskochen mit Säure, Lauge und Wasser gründlich gereinigt worden ist. Der so vorbereitete Trichter ist ohne Erneuerung von Asbest für 20 bis 30 Einzelbestimmungen brauchbar, er muß nur zwischen den einzelnen Bestimmungen mittels Durchsaugens heißer Luft getrocknet werden.

*) Ritthausen, Journ. f. prakt. Chemie. Neue Folge **15**, 329.

) W. Schmid und Bondzyński, Zeitsch. f. analyt. Chemie **30, 728.

***) Gerber, Laktobutyrometer. Molkereiztg. 1889, pag. 137.

Legt man die Zahlen der obigen Tabelle zugrunde und setzt man die Fettmenge nach Ritthausen, Schmid-Bondzyński und Gerber gleich 100, so beträgt die Ausbeute an Fett nach unserer Methode 103,45 bezw. 103,6 und 104 Proz., d. h. 3,45, 3,6 und 4 Proz. mehr. Nach diesem Ergebnis halten wir uns für berechtigt, anzunehmen, daß unsere Methode für genaue Milchfettbestimmungen den bisher gebräuchlichen Methoden vorzuziehen ist.

Herstellung einer geeigneten Pepsinsalzsäure.

Bei dieser Schlußfolgerung ist stillschweigend vorausgesetzt, daß die benutzte Pepsinsalzsäure kein Ätherextrakt enthielt. Eine solche fast ätherextraktfreie Pepsinsalzsäure von ausgezeichneter Wirksamkeit ließ sich durch folgendes Verfahren erhalten:

Die Magenschleimhaut eines eben geschlachteten Schweines wurde mittelst Bürste möglichst von Schleim befreit, abgewaschen, und der rotgefärbte Fundusteil zu einem feinen Brei*) zerhackt, in 1 Liter Salzsäure von 0,5 Proz. eingebracht und bei 40° C. 15 bis 20 Stunden digeriert. Dann wurde Blutkohle (Merck), etwa 20 g, ($^1/_{50}$ der Flüssigkeit), zugesetzt, die Digestion noch einige Stunden fortgesetzt, schließlich die Flüssigkeit auf ein Faltenfilter gebracht. Das Filtrat ist anfangs in der Regel trüb, wird aber bei wiederholtem Zurückgießen klar und geruchlos. Die Filtration selbst geht sehr glatt vor sich.

Die so erhaltene Pepsinsalzsäure ist bei Verwendung gereinigter Blutkohle fast vollkommen farblos und wasserklar, bei Benutzung roher Blutkohle (Merck) ebenfalls klar, jedoch infolge eines geringen Eisengehalts gelblich gefärbt. 100 ccm dieser Pepsinsalzsäure gaben, in unserem Apparate 30 Stunden lang extrahiert, nur 0,0019 g Rückstand. Da wir von dieser Pepsinsalzsäure zu einer Bestimmung höchstens 50 ccm gebrauchen, so kann man dieselbe wohl als ätherextraktfrei betrachten.

Eine Analyse der Pepsinsalzsäure, welche mit der gereinigten Blutkohle Merck behandelt worden war, ergab folgende Zusammensetzung pro 100 ccm:

Gesamtazidität (Indikator: Phenolphtalein): 117 ccm $^1/_{10}$ Normal-NaOH; freie Säure (Indikator: Tropaeolin 00): 83 ccm $^1/_{10}$ Normal-NaOH; Trockensubstanz (einschließlich des durch Neutralisation gebildeten Salzes): 1,737 g; dieselbe nach Abzug von Chlornatrium: 1,0495 g; Asche, (die Substanz ohne Neutralisation direkt eingedampft und verascht): 0,0896 g; Gesamt-N (nach Kjeldahl): 0,1498 g; Eiweißstoffe (N $\times$ 6,25): 0,9363 g.

Es ist bemerkenswert, daß die Behandlung mit Tierkohle die Verdauungskraft der Pepsinlösung kaum beeinträchtigt hatte.

---

*) Von einer Magenschleimhaut bekommt man durchschnittlich etwa 100 g Schleimhautbrei.

Tabelle IV.

200 g Schleimhautbrei werden mit 2 Liter Salzsäure von 0,5 Proz. 15 Stunden bei 40° C. verdaut. Von der überstehenden Flüssigkeit werden 250 ccm zur Untersuchung entnommen.

	A ohne Zusatz direkt abfiltriert	B vorher mit 5,0 roher Blutkohle Merck 1 Std. digeriert	
Filtration	sehr langsam nach 48 Stunden noch nicht vollendet	fast momentan	
Filtrat	stark getrübt	klar und gelblich gefärbt	
N-Gehalt in 100 ccm Filtrat	0,210 g	0,192 g	
Gesamt-Azidität in 100 ccm	134 ccm $^1/_{10}$ Normal-Na OH	77 ccm $^1/_{10}$ Normal-Na OH	
Zusammensetzung der Verdauungsproben	Pepsinlösung A 10 ccm, Salzsäure von 0,5 Proz. 90 ccm, Fleischpulver 5,0 g (mit 0,6351 g N); Gesamtvolumen 100 ccm	Pepsinlösung B 10 ccm, Salzsäure von 10 Proz. 0,22 ccm, Salzsäure von 0,5 Proz. 89,78 ccm, Fleischpulver 5,0 g (mit 0,6351 g N); Gesamtvolumen 100 ccm	Gesamtvolumen, Salzsäuregehalt und zugesetzte Fleischmenge genau gleich gehalten
Digestionsdauer	3 Std. bei 40° C.	3 Std. bei 40° C	
$^{19}/_{20}$ der Gesamt-Azidität neutralisiert mit	13 ccm Normal-Na OH	13 ccm Normal-Na OH	
15′ im Dampftopf erhitzt und aufgefüllt auf	200 ccm	200 ccm	Kalt aufgefüllt und trocken abfiltriert, von dem Filtrat je 10 ccm nach Kjeldahl auf N-Gehalt untersucht
Gesamt-N in der Lösung	0,5572 g	0,5348 g	
N in 10 ccm Pepsinlösung	ab 0,0210 g	ab 0,0192 g	
N des aufgelösten Fleisches	0,5362 g	0,5156 g	
Verdaut in Proz.	85 Proz.	81 Proz.	

Die behufs Vergleiches absichtlich für die Verdauung ungünstig gewählte Mischung — 100 ccm mit 0,5 Proz. Salzsäure und je 10 ccm Pepsinlösung auf eine relativ sehr reichliche Fleischmenge (5,0 g lufttrocknen Pulvers) — gestattet die verdauende Kraft beider Proben mit genügender Exaktheit zu beurteilen. Die Wirkung

der mit Blutkohle behandelten Probe erscheint insofern beeinträchtigt, als dieselbe von dem zugesetzten Fleisch bei dreistündiger Digestion 81 Proz. auflöste, während die in der Kontrollprobe in derselben Zeit aufgelöste Fleischmenge 85 Proz. betrug. Doch ist dieser Unterschied im Vergleich zu der energischen Verdauungswirkung überhaupt so unbedeutend, daß uns die fermentbindende Eigenschaft der Kohle zweifelhaft erscheint. Wir neigen eher der Ansicht zu, daß die Kohle Ätherextrakt und jene Substanzen zurückhält, welche die aus der frischen Magenschleimhaut zubereitete Pepsinsalzsäure schwer filtrierbar machen, während sie Pepsinferment ungehindert durchläßt.

Bei Verwendung dieser Pepsinsalzsäure entfallen die Schwierigkeiten, welche sich sonst aus dem Fettgehalt und der Schwerfiltrierbarkeit der Schleimhautinfuse zu ergeben pflegen.

Wir behalten uns vor, auf die von uns ausgeführten Bestimmungen des Fettgehalts von Blutserum und Aszitesflüssigkeit in einer weiteren Mitteilung einzugehen.

16. Mai 1903.

XVI.

Die Überführung von Cystin in Taurin im tierischen Organismus.

Von **G. v. Bergmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

I.

Die oft besprochene Frage, in welcher Form der Schwefel im Eiweiß enthalten ist, scheint jetzt nach langem Bemühen dahin beantwortet, daß manche Eiweißkörper den gesamten Schwefel, andere jedenfalls einen großen Teil in Form einer Cysteïngruppe enthalten (Mörner)[1]. E. Friedmann[2] verdanken wir die definitive Feststellung der Konstitutionsformel des Eiweißcysteïns als einer *α*-Amino-*β*-thiomilchsäure und den Nachweis, daß Cystin bezw. Cysteïn sich auf einfache Weise durch Oxydation in Taurin überführen läßt. Damit ist eine ganze Anzahl physiologischer, früher ohne Erfolg oder mit halbem Gelingen bearbeiteter Probleme des Schwefelstoffwechsels der Untersuchung zugänglich geworden. Unter ihnen drängt sich in erster Linie die Frage auf: stammt das Taurin, das im Organismus stetig entsteht und hauptsächlich in der Galle zu finden ist, aus dem Cystin des Eiweißes? Ferner, wenn der Organismus die Fähigkeit besitzt das Eiweißcystin in Taurin überzuführen, durch welchen chemischen Vorgang bringt er das zuwege, welche Zwischenprodukte entstehen dabei, vollzieht sich dieser Prozeß in einer oder mehreren Phasen? E. Friedmann hat am Schlusse seiner eben zitierten Arbeit[2] diese Fragen aufgeworfen, die sich ihm als Folge seiner Resultate unmittelbar aufdrängten. In der nachstehenden Untersuchung habe ich es versucht, von Herrn Professor Hofmeister darauf hingewiesen, die erste der hieraus erwachsenden Aufgaben einer Lösung zuzuführen.

Die Untersuchungen gingen zunächst dahin, festzustellen, ob nach Fütterung mit Cystin das Taurin der Galle sich vermehrt zeige

Verwandte Fragestellungen sind auch früher schon aufgeworfen worden, als man noch keine bestimmten schwefelhaltigen Kerne des Eiweißmoleküls kannte. Die älteren Arbeiten konnten daher lediglich die Frage behandeln: In welcher Beziehung steht die Menge des mit dem Nahrungseiweiß zugeführten Schwefels zu der in Form von Taurin ausgeschiedenen Schwefelmenge?

Schon Bidder und C. Schmidt[3)] haben die Frage angeregt, ohne sie zum Abschluß zu bringen. Aus den von ihnen mitgeteilten, nur orientierenden und methodisch nicht einwandsfreien Versuchen geht allenfalls hervor, daß die in der Galle ausgeschiedene Schwefelmenge innerhalb weiter Grenzen von dem Schwefelgehalt der Nahrung unabhängig ist: Sie fanden einmal in der Galle mehr Schwefel als in der zugeführten Nahrung. In anderen Versuchen jedoch sahen sie nur 56 bis 31 Proz. des Nahrungsschwefels in der Galle zur Ausscheidung kommen.

Mit exakter Methodik und klarer Fragestellung nahm A. Kunkel[5a)] auf Karl Ludwigs Veranlassung die Frage wieder auf. Kunkel faßt die Ergebnisse dieser ersten Arbeit später in folgender Weise zusammen:

„Von dem ganzen im Nahrungseiweiß aufgenommenen Schwefel wird ein bestimmter aliquoter Teil täglich mit der Galle ausgeschieden. Diese Menge nimmt zu und ab mit der Größe der Zufuhr, indes so, daß bei großer Nahrungsaufnahme ein prozentisch geringerer Teil in der Galle zur Ausscheidung kommt als bei kleinerer Nahrungsaufnahme." — „8 bis 30 Proz. des als Eiweiß eingeführten Schwefels erschienen in der Galle als Taurin wieder, die geringeren Prozentzahlen bei größter Aufnahme. Merkwürdig war noch, daß die auf Steigerung der Nahrung folgende Vermehrung der Galle nicht sofort, sondern erst am zweiten, selbst dritten Tage der vergrößerten Zufuhr erfolgte." Die Versuche der zweiten einschlägigen Untersuchung Kunkels[5b)] haben diese Schlüsse im ganzen bestätigt, doch sind die beobachteten Unterschiede in der Größe der Schwefelausscheidung durch die Galle keineswegs immer große.

P. Spiro[6)], ebenfalls durch Karl Ludwig dazu angeregt, führte diese Versuche weiter. Er kommt zu Resultaten, die im ganzen mit denen von Kunkel übereinstimmen und sie in wesentlichen Punkten ergänzen:

„Der durch die Galle ausgeführte Schwefel stellt einen um so kleineren Bruchteil des mit dem Harne abgegangenen dar, je reicher die Nahrung an Eiweißstoffen war." — „Der chemische Prozeß, welchem die Taurocholsäure ihre Entstehung verdankt,

bewahrt sich demnach einen hohen Grad von Unabhängigkeit, gegenüber denjenigen, welche zur Bildung von schwefelhaltigen Produkten führen, die ihren Ausweg durch die Nieren finden.“ Am augenfälligsten wird das durch die Tatsache bewiesen, daß bei etwa achtfacher Vermehrung des Schwefels in der Eiweißnahrung die Menge des Gallenschwefels nur um das Doppelte steigt. Endlich findet auch Spiro, gerade so wie Kunkel, daß die Schwankungen in der Schwefelausscheidung durch die Galle erst zwei bis drei Tage nach Änderung der Schwefelmenge des Eiweißfutters eintreten.

Damit war eine Zunahme des Gallenschwefels und somit, nach allgemein festgehaltener Annahme, des Taurins nach reichlicher Eiweißzufuhr bewiesen, es schien also die Vorstellung, daß das Taurin aus dem Nahrungseiweiß stammt, wohl begründet; merkwürdig blieb, und das betonen Kunkel und Spiro ja auch ausdrücklich, die anscheinend doch recht große Unabhängigkeit der Gallenschwefelausscheidung vom allgemeinen Eiweißumsatz. Es geht schon daraus hervor, daß eine unmittelbar an die Eiweißresorption sich anschließende Umwandlung des Eiweiß-Schwefelkomplexes zu Taurin nicht notwendig gegeben ist, und daß die Leber, auch bei mangelnder Eiweißzufuhr, erhebliche Taurinmengen bilden kann. Für diesen Fall ist die Annahme nicht zu umgehen, daß der Leber noch andere Bezugsquellen für den Taurinschwefel zu Gebote stehen als das resorbierte Nahrungseiweiß. Dadurch wird aber die Erwägung nahe gelegt, daß auch die nach Eiweißzufuhr beobachtete Vermehrung des Gallenschwefels möglicherweise nicht aus dieser selbst stammt, sondern nur dadurch zustande kommt, daß die erhöhte Eiweißzufuhr unbekannte Bezugsquellen vorübergehend ergiebiger macht. Da diese Bezugsquellen in letzter Reihe den Schwefel auch aus dem der Nahrung beziehen müssen, so würde es sich bei diesem Bedenken vor allem darum handeln, ob nicht mit der Nahrungsaufnahme verknüpfte Vorgänge, z. B. die Änderung der Gallensekretion infolge anderer Quantität und Qualität der Nahrung, zunächst unabhängig von der Menge des Eiweißschwefels, einen Einfluß ausüben können.

Mit den alten Mitteln hier zu einem befriedigenden Verständnis zu gelangen, war wenig aussichtsvoll. Aus den oben erwähnten Resultaten Mörners und Friedmanns ergibt sich aber ein neuer Gedankengang: Genügt es nicht, statt des gesamten Eiweißmoleküls nur denjenigen Kern einzuführen, aus dem der Organismus das Taurin bereitet, damit es in vermehrter Menge in der Galle erscheine?

Diesem Gedankengang folgend war die Versuchsanordnung folgendermaßen gegeben: Statt Eiweiß zu verfüttern, wie Kunkel und Spiro es taten, mußte einfach Cystin, bei sonst völlig sich gleichbleibender Kost, gereicht und die Zunahme des Taurins der Galle bestimmt werden.

II. Zur Versuchsmethodik.

a) Die Anlegung der Gallenfistel. Dem 4,6 Kilo schweren Hunde „A" und dem 8,5 Kilo schweren Hunde „B" wurden komplette Gallenfisteln nach der Methode von Dastre[7] angelegt.

Die Methode hat sich mir vorzüglich bewährt, beide Hunde hatten nach etwa fünf Tagen die Folgen der Operation völlig überwunden, die Fistel schloß absolut dicht um die Kanüle, so daß jeder Tropfen in den am Halsband aufgehängten Gummibeutel lief. Diese, ebenfalls von Dastre[7] angegebene Befestigung bezweckt, einen direkten Zug des gefüllten Beutels an der Kanüle zu vermeiden. Sie hat sich ebenfalls als recht zweckmäßig erwiesen, obwohl es ab und zu vorkam, daß der Gummischlauch sich von der Kanüle löste oder sich am Ende der Kanüle durchscheuerte. Künftig würde sich das leicht durch ein an der Kanüle aufzuschraubendes, geeignet gebogenes Ansatzstück vermeiden lassen. Die angedeuteten Zufälligkeiten sind der hauptsächlichste Grund dafür, daß die Gallenbestimmungen einiger, in die Versuchsperioden fallender Tage fehlen, dazu kamen noch zwei- oder dreimal andere Versehen, wie sie bei längerer Versuchsdauer kaum zu vermeiden sind.

b) Ernährung der Tiere. Das Befinden der Hunde war während der Versuchsdauer stets gut, die Nahrung nahmen sie vollständig zu sich, die großen Schwankungen in der Appetenz der Gallenfisteltiere, von denen vielfach berichtet wird, habe ich nicht beobachten können.

Der Hund A bekam während der ganzen Zeit (vom 11. Dez. 1902 bis 22. März 1903) täglich um 1 Uhr mittags 50 g Fleisch und 150 g Reis; sein Gewicht blieb im wesentlichen konstant 4,6 Kilo, nur bei der letzten Wägung am 18. März war es auf 4,3 Kilo herabgegangen.

Der Hund B bekam täglich um 1 Uhr mittags 200 g Fleisch, 150 g Reis und 30 g Kaseïn (als möglichst schwefelarmen Eiweißkörper). Auch dieser hielt sich konstant auf dem Gewicht von 8,5 Kilo.

c) Die Verarbeitung der Galle. Die im Gummibeutel sich sammelnde Galle wurde mehrmals am Tage entleert und die einzelnen Portionen stets von 24 Stunden, von 12 Uhr mittags bis 12 Uhr mittags, vereinigt. Das Datum der Tabellen bezeichnet immer den zweiten Tag.

Während der ersten Versuchsperiode wurde jede 24stündige Gallenportion mit einem vielfachen Volumen 96 proz. Alkohols versetzt, vom Niederschlag (Gallenmucin u. a.) abfiltriert, der Niederschlag sechs bis achtmal mit Alkohol nachgewaschen und das mit der Waschflüssigkeit vereinigte Filtrat auf ein bestimmtes Volumen eingeengt (150 ccm). Von diesem

Volumen wurde ein bestimmter Teil, je 1/5 (30 ccm), zur Bestimmung des Gesamtschwefels (nach v. Asbóth) verwandt. Es wurden für jede Schwefelbestimmung zwei Analysen ausgeführt, deren Ergebnisse (das Gewicht des Baryumsulfats) aus den Tabellen zu ersehen sind.

Von der Versuchsperiode II an wurde die Methode vereinfacht. Die abgemessene Galle wurde gleich mit 96proz. Alkohol auf ein bestimmtes Volumen (bei Hund A 250 ccm, bei Hund B 500 ccm) aufgefüllt, ohne daß der entstehende Niederschlag entfernt wurde. Indem ich hinterher Sorge trug, daß sich die Konzentration nicht mehr änderte, filtrierte ich, ohne nachzuwaschen, vom Niederschlage in ein gut verschließbares Gefäß ab. Es ist richtig, daß dabei das Volumen, das der Niederschlag einnimmt, mitgerechnet wird, als wenn es von der umgebenden Flüssigkeit eingenommen wäre. Aber das Volumen des trockenen Niederschlages macht nicht einmal einen Kubikcentimeter aus. Auf 250 bis 500 ccm Flüssigkeit also weniger als 0,4 bis 0,2 Proz. des Gesamtvolumens. Das geht schon aus dem Gesamtgewicht des Mucins und der anderen mit Alkohol fällbaren Bestandteile der Galle hervor.

Von allen Untersuchern wird der Schwefel der Galle, bezw. des alkohollöslichen Teiles der Galle, stets ganz als Taurin-Schwefel aufgefaßt. Schon Kunkel hat gezeigt, daß die Menge des Sulfatschwefels nur einen zu vernachlässigenden Fehler veranlaßt. Ich habe fünf verschiedene, in meiner Art mit dem vier- bis fünffachen Volumen Alkohol versetzte Gallenproben vereinigt und auf Sulfat untersucht und dabei überhaupt kein Baryumsulfat bekommen, obwohl ich 100 ccm Galle zur Untersuchung verwandte. Es waren sonach die etwa vorhandenen Sulfate zusammen mit dem Mucin ausgefällt. Meine Schwefelzahlen sind also in dieser Richtung einwandsfrei.

Eine andere Fehlerquelle könnte bedeutungsvoller werden: Hammarsten hat in der Galle verschiedener Wirbeltiere und auch des Menschen Ätherschwefelsäuren, beim Hai in beträchtlicher Menge, nachgewiesen[8]. Wir dürfen also nur dann die gesamte Schwefelmenge der Galle auf Taurin beziehen, wenn wir sicher sind, daß Hundegalle keine Ätherschwefelsäuren enthält. Freilich ist, so häufig auch Hundegalle analysiert worden ist, hier nie Schwefel in dieser Bindung nachgewiesen worden. Zur größeren Sicherheit habe ich einige beliebig ausgewählte Proben von verschiedenen Tagen vereinigt und zusammen auf Ätherschwefelsäuren untersucht. Ich benutzte dazu die fünf Gallenproben, mit denen ich die Sulfatbestimmung versucht hatte. Ich zersetzte die barythaltige Flüssigkeit mehrere Stunden mit Salzsäure, dampfte zur Trockene ein, nahm mit Alkohol und Wasser vollständig auf, sammelte das Ungelöste auf einem aschefreien Filter und wusch mit Wasser, verdünnter Salzsäure, Alkohol und Äther wiederholt nach. Es blieb kein wägbarer Rückstand zurück. Ätherschwefel-

säuren waren also in unseren Proben nicht vorhanden. — Da irgend ein anderer alkohollöslicher schwefelhaltiger Körper in der Galle nicht bekannt ist, bin ich berechtigt, die Zahlen für den Gesamtschwefel der mit Alkohol versetzten Galle auf Taurin zu beziehen.

Die beschriebene Behandlung der Gallen scheint für Schwefelbestimmungen geeigneter als das Extrahieren des eingedampften Rückstandes mit Alkohol, denn Taurocholsäure kann beim Eindampfen leicht zerlegt werden und Taurin ungelöst im eingedampften Rückstand bleiben.

Handelte es sich nur um Bestimmungen der physiologischen Schwefelausscheidung, so habe ich öfters, nachdem ich die Schwankungen einmal festgestellt hatte, mehrere Tagesportionen vereinigt und nachher die Ausscheidung für 24 Stunden im Mittel berechnet; die Tabellen deuten das stets an. Zu rascher Übersicht empfiehlt es sich besonders die letzte Spalte aller Tabellen zu berücksichtigen, auf der die 24stündige Schwefelmenge verzeichnet ist.

d) Über die Darstellung des Cystins nach Mörner und Embden verweise ich auf die oben zitierte Friedmannsche Arbeit[2]. Es wurden stets reine Präparate verwendet. Das cholsaure Natron, von dem ich später Gebrauch machte, war aus Rindergalle erhalten und ebenfalls völlig rein. Alle Präparate wurden den Hunden in Gelatinekapseln verabfolgt.

Wir können nun zur Besprechung der Versuche übergehen.

III. Hat die Zufuhr von Cystin eine vermehrte Taurinausscheidung zur Folge?

Entsprechend den obigen Ausführungen verfütterten wir zunächst Cystin bei sonst völlig gleichbleibender Kost. (Siehe Versuchsreihe I.)

Betrachtet man die umstehende Zusammenstellung, so könnte es scheinen, als wenn nach der Gabe von 2,5 g Cystin eine lang andauernde allmähliche Steigerung der Schwefelausscheidung in der Galle stattgefunden hätte. An dem Vortage erhielt ich 0,034 g für die 24stündige Schwefelmenge, dann stiegen die Zahlen auf 0,042, 0,051, 0,054 und mit einer Remission weiter auf 0,062. Wie wenig jedoch auf diese Zunahme Gewicht zu legen ist, lehrt die Versuchsreihe II (S. 199), die ein Bild von der Größe der physiologischen Schwankungen überhaupt gibt. (Siehe Versuchsreihe II Seite 199.)

Es wurden erst 20 Tage lang die physiologischen Schwankungen des Gallenschwefels beobachtet und erst dann wurde, um eine deutliche Gallenschwefelvermehrung zu erhalten, eine größere Dosis Cystin, d. h. zweimal 2 g, eingeführt.

Versuchsreihe I.

Hund „A". Gewicht 4,6 Kilo. Erhält täglich 50 g Fleisch und 150 g Reis.

Verfüttert	Datum	Tagesmenge	Gewogenes $BaSO_4$ Kontroll-analysen	Gewogenes $BaSO_4$ Mittel	$BaSO_4$ auf die Gesamtmenge berechnet	S in der Gesamtmenge d. Galle	S in 24 Stdn. im Mittel
	XII. 02						
	12.		0,0480 0,0520	0,0500	0,2500	0,0343	**0,034**
2,5 g Cystin	13.		0,0600 0,0613	0,0607	0,3035	0,0417	**0,042**
	14.		0,0753 0,0730	0,0742	0,3710	0,0509	**0,051**
	15.		0,0777 0,0790	0,0784	0,3920	0,0538	**0,054**
	16.		0,0691 0,0670	0,0681	0,3405	0,3468	**0,047**
	17.		0,0879 0,0914	0,0897	0,4485	0,0616	**0,062**
	18.		0,0859 0,0837	0,0848	0,4240	0,0582	**0,058**

Die Versuchsreihe II zeigt, daß die Schwankungen in der 24stündigen Schwefelmenge 0,028 bis 0,055 betragen können, d. h. daß das Maximum den Minimalwert fast ums Doppelte übertreffen kann. Da hier während und nach der Cystinfütterung eine Steigerung nicht konstatiert werden kann, dürfte auch die höchste Zahl der Reihe I (0,062) noch in die Breite der physiologischen Schwankungen zu rechnen sein. Stadelmann[4)] schon betont wiederholt die großen Schwankungen in der täglichen Menge aller Gallenbestandteile. Jedenfalls gibt weder das Verhalten des Hundes, noch sonst irgend etwas Veranlassung, die Zuverlässigkeit der höchsten oder niedersten Werte anzuzweifeln, so daß mit einer so großen Breite der physiologischen Schwankungen notwendig gerechnet werden muß. Angesichts solcher Tatsachen läßt sich unmöglich behaupten, daß die Zahlen an den Tagen der Cystinfütterung oder kurz darnach irgend eine Steigerung der Schwefelausfuhr bewiesen; es ist richtig, daß sie näher

Versuchsreihe II.

Hund „A". Unter den gleichen Bedingungen wie in Reihe I.

Verfüttert	Datum	Tagesmenge ccm	Vereinigte Gallenmengen ccm	Gewogenes $BaSO_4$ Kontrollanalysen	Gewogenes $BaSO_4$ Mittel	$BaSO_4$ auf die Gesamtmenge berechnet*)	S in der Gesamtmenge d. Galle	S in 24 Stdn. im Mittel
	I. 03							
2 Tage	21. 22.	65 68	133	0,1200 0,1231	0,1216	0,6080	0.0835	**0,042**
	[23.]	fehlt						
2 Tage	24. 25.	70 67	137	0,1002 0,1006	0,1004	0,5020	0,0689	**0,034**
2 Tage	26. 27.	70 72	142	0,1599 0.1585	0,1592	0,7960	0,1093	**0,055**
2 Tage	28. 29.	71 75	146	0,0813 0.0814	0,0814	0,4070	0,0559	**0,028**
	[30.] [31.]	fehlt fehlt						
	II. 03							
2 Tage	1. 2.	62 65	127	0,1170 0,1166	0,1168	0,5840	0,0802	**0,040**
2 Tage	3. 4.	78 75	153	0,1533 0,1526	0,1530	0,7650	0,1050	**0,053**
8 Tage	5. 6. 7. 8. 9. [10.] 11. 12. 13.	73 68 65 70 66 fehlt 63 52 64	521	0,1116 0,1052	0,1084	2,7100	0,3721	**0,047**
2,0 g Cystin 2 Tage 2,0 g Cystin	14. 15.	70 56	126	0,1479 0,1413	0,1446	0,7230	0,0993	**0,050**
2 Tage	16. 17.	74 69	143	0,1587 0,1592	0,1590	0,7950	0,1092	**0,055**
2 Tage	18. 19.	66 61	127	0,1347 0,1383	0,1365	0,6825	0,0937	**0,047**
7 Tage	20. 21. 22. 23. 24. 25. 26.	56 50 52 55 62 48 46	369	0,0968 0,0972	0,0970	2,4250	0,3330	**0,048**

*) Für gewöhnlich wurde bei Hund „A" je 1/5 der Galle zur Analyse verwendet, für die sieben und acht vereinigten Tage nur je 1/25.

der oberen Grenze der Normalzahlen liegen, als der unteren. Aber es wäre bedenklich, daraus einen Schluß zu ziehen.

Wir müssen also folgern: **Cystinfütterung, bei sonst gleichbleibender Nahrung, steigert den Tauringehalt der Galle nicht nachweislich.**

Dieses negative Resultat war dem zunächst erwarteten entgegengesetzt. Damit konnte aber die chemisch so gut gestützte Überlegung, von der ich ausging, nicht als widerlegt angesehen werden. Es war daher nach einer anderen Erklärung zu suchen, die sich aus folgender Überlegung zu ergeben schien.

Es wird fast allgemein angenommen, daß die Hundegalle ausschließlich oder fast ausschließlich Taurocholat enthält, d. h. daß alle Cholsäure an Taurin gebunden ausgeschieden wird. Eine Zunahme des Taurins in der Galle wäre also nur denkbar, wenn auch mehr Cholsäure sezerniert würde. Unser negatives Resultat könnte demnach auf der Unfähigkeit des Hundeorganismus beruhen, für das vorhandene Taurin mehr Cholsäure verfügbar zu machen.

Ist diese Annahme richtig, so mag noch soviel Cystin vom Organismus in Taurin umgewandelt werden, den Weg in die Galle kann es doch nicht finden, da ihm der geeignete, es vor Verbrennung schützende Paarling fehlt. Hieraus ergibt sich die Aufgabe, zunächst den Organismus in die Lage zu setzen, mehr Gallensäure zu liefern als in der Norm, und zwar eine für Taurinbindung verfügbare Gallensäure.

Daß Gallensäuren vom Darme leicht resorbiert und dann mit der Galle schnell ausgeschieden werden, ist eine vielfach festgestellte Tatsache; hat ja die Frage des Gallenkreislaufs zahlreiche Forscher eingehend beschäftigt. Teils wurde dem Versuchstier Rindergalle, Hundegalle oder andere Galle beigebracht, teils reines glykocholsaures, oder taurocholsaures Natron eingeführt. Fast alle Forscher fanden danach sowohl die Gallenmenge vermehrt, als auch die Menge der gallensauren Salze. Die Ausscheidung der letzteren erreichte etwa nach sechs Stunden ihr Maximum und war nach zwölf Stunden so gut wie vollständig beendet. Wie namentlich Stadelmann[9] gezeigt hat, bei dem man wohl die gesamten bis dahin unternommenen Versuche verwertet findet[4 u. 9], können die gepaarten Gallensäuren, die in den Organismus eingeführt worden sind, fast ohne Verlust aus der Gallenfistel wiedergewonnen werden.

Ob beim Hund eingeführte Glykocholsäure nur als solche, oder nicht wenigstens zum Teil zu Taurocholsäure umgewandelt in der Galle erscheint, ist nicht ganz sicher festgestellt. Während einige Forscher eine völlige Umformung der Glykocholsäure in Taurocholsäure annahmen, machten andere den direkten Über-

gang von Glykocholsäure in die Hundegalle sehr wahrscheinlich (Weiss)[10], und Stadelmann[9] bewies ihn einwandsfrei, indem er aus der Galle eines Hundes, den er mit glykocholsaurem Natron gefüttert hatte, Glykokoll darstellen konnte. Durch Fütterung eines Hundes mit Glykocholsäure ließe sich also eine Galle erzielen, die vielleicht unserem Zwecke entspräche, d. h. uns eine Gallensäure in der Galle lieferte, die nicht mit Taurin gepaart ist. Die gleichen Verhältnisse böte uns auch ein Tier, das schon in der Norm reichlich Glykocholsäure in der Galle enthielte. Aber es würde sich da immer noch fragen, ob die bereits gepaarte Verbindung so ohne weiteres das Glykokoll gegen Taurin eintauschen kann. Auch müßte man daran denken, daß vielleicht die Einführung einer dem Hundeorganismus, wenigstens in größeren Mengen, offenbar fremden Verbindung die Leberfunktion in unberechenbarer Weise stören könnte. Aus diesen Gründen schien es aussichtsvoller, dem Hunde einfach cholsaures Natron zuzuführen. Freilich ergab sich damit die Notwendigkeit, zuerst festzustellen, ob dadurch an und für sich eine veränderte Schwefelausscheidung in der Galle veranlaßt wird.

IV. Die Zufuhr von Natriumcholat bedingt eine erhöhte Schwefelausscheidung in der Galle.

Fütterungen mit der nicht gepaarten Cholsäure bezw. ihrem Natronsalz sind zum Zwecke von Gallenanalysen meines Wissens nur von Weiss[10] ausgeführt*). Weiss zeigte, daß nach Fütterung eines Hundes mit Cholsäure die Gallensäuren in der Galle vermehrt sind. Ein Teil der verfütterten Cholsäure soll mit Taurin gepaart zur Ausscheidung kommen. Von dem Rest nimmt Weiss an, daß er in Glykocholsäure übergeht. Er weist dann nach, daß dieser andere Teil, also nach ihm die Glykocholsäure, abnimmt, wenn man mit der Cholsäure zusammen noch Taurin verfüttert. Daraus schließt er, daß die Glykocholsäure vielleicht erst dann auftritt, wenn der Taurinvorrat des Körpers erschöpft ist. Keines dieser Resultate ist an Gallenfisteltieren gewonnen. Weiss untersuchte nur die Galle der nach einer Fütterung von mehreren Tagen getöteten Tiere. So fehlen uns quantitative Vorstellungen über diese Vorgänge, die man nur nach Ausschluß des Gallenkreislaufs gewinnen kann, d. h. eben am Gallenfisteltiere. Auf

*) Das Original der in Moskau in russischer Sprache erschienenen Dissertation war mir leider nicht zugänglich, wohl aber lagen mir ausführliche Referate vor, darunter ein Autoreferat in den Berichten der Moskauer Akademie der Naturforscher veröffentlicht.

andere Mängel der Methodik weist Stadelmann[9] hin, so vor allem darauf, daß der Beweis für das Auftreten von Glykocholsäure nur indirekt geführt ist, insofern die Analysen mehr Cholsäure ergeben, als nach den Schwefelbestimmungen auf Taurocholsäure berechnet werden kann. Auch die absolute Zuverlässigkeit der Zahlen für den Gallenschwefel stellt Stadelmann mit Recht in Frage.

Da man heutigentags eine exakte Methode zur quantitativen Glykokollbestimmung noch nicht besitzt, haben wir auf eine Beantwortung der Frage nach Auftreten und Menge der Glykocholsäure verzichtet, die sich eben nur durch indirekte Bestimmungen hätte erreichen lassen. Nur qualitativ Glykokoll nachzuweisen (Stadelmann)[9] schien uns ebenfalls für unsere Zwecke unzureichend.

Immerhin bleiben die Resultate von Weiss für uns sehr bemerkenswert, denn er findet, um es kurz zusammenzufassen, daß man die Schwefelmenge der Galle steigern kann, wenn man einem Hund nur cholsaures Natron gibt; gibt man ihm aber gleichzeitig noch Taurin, so steigt die Schwefelmenge noch mehr, vermutlich unter entsprechender Abnahme einer schwefelfreien gepaarten Gallensäure (Glykocholsäure?).

Wir hatten also den Befund von Weiss am Gallenfistelhunde nachzuprüfen und zunächst festzustellen, ob sich nach Fütterung mit cholsaurem Natron mehr Taurin in der Galle finde als vorher.

Die folgenden Versuchsreihen (III und IV) zeigen, daß die Schwefelmenge der Galle sich in der Tat nach Fütterung mit cholsaurem Natron vermehrt zeigt.

Versuchsreihe III.

Hund „A“. Unter den gleichen Bedingungen wie in Reihe I und II.

Verfüttert	Datum	Tagesmenge ccm	Gewogenes $BaSO_4$ Kontrollanalysen	Gewogenes $BaSO_4$ Mittel	$BaSO_4$ auf die Gesamtmenge berechnet	S in der Gesamtmenge d. Galle	S in 24 Stdn. im Mittel
	II. 03						
1,0 g cholsaures Natron	27.	87	0,1407 0,1373	0,1390	0,6950	0,0954	**0,095**
	28.	65	0,0655 0,0702	0,0679	0,3395	0,0466	**0,047**

Der Versuch reihte sich ohne Unterbrechung der Reihe II an, so daß die dort gegebenen Normalzahlen auch hierher gehören. Bei Fütterung mit 1,0 g Natriumcholat sehen wir, außer Vermehrung der Gallenflüssigkeit, einen Anstieg von 0,048 auf 0,095, einen Wert, der auch die höchste Normalzahl beträchtlich übersteigt. Nun gaben wir die doppelte Menge Natriumcholat. Reihe IV zeigt den Erfolg.

Versuchsreihe IV.

Hund „A". Unter den gleichen Bedingungen wie in Reihe I bis III.

Verfüttert	Datum	Tagesmenge ccm	Gewogenes $BaSO_4$ Kontroll-analysen	Gewogenes $BaSO_4$ Mittel	$BaSO_4$ auf die Gesamtmenge berechnet	S in der Gesamtmenge d. Galle	S in 24 Stdn. im Mittel
	III. 03						
2,1 g cholsaures Natron	6.	116	0,1500 0,1515	0,1508	0,7540	0,1035	**0,104**
	7.	59	0,0564 0,0586	0,0575	0,2875	0,0395	**0,040**
	8.	69	0,0808 0,0772	0,0790	0,3950	0,0542	**0,054**
	9.	71	0,0754 0,0717	0,0736	0,3680	0,0505	**0,051**

Nach Darreichung von 2,1 g cholsaurem Natron folgt also eine Steigerung auf 0,104. Beim Vergleich mit der Steigerung nach 1,0 g Natriumcholat fällt auf, daß die Schwefelausscheidung offenbar nicht proportional der Cholsäurezufuhr ansteigt. Sollte nicht genug Taurin verfügbar sein, um eine proportionale Taurocholsäureproduktion zu bewirken?

Weiss deutet diesen Zusammenhang an einer Stelle an. Es wäre gerade das, was wir für unsere Fütterung mit Cystin wünschten, nämlich, daß dem Organismus Cholsäure zur Verfügung stände, für die ihm das nötige Taurin fehlt. Dabei kann vorläufig dahingestellt bleiben, ob diese vielleicht verfügbare Cholsäure als Glykocholsäure oder in anderer Bindung in der Galle erscheint, ebenso die weitere Frage, warum erscheinen nur etwa zwei Drittel der eingeführten Cholsäure als Taurocholsäure wieder, eine Frage, welche nur durch eine quantitative Unter-

suchung der aufgenommenen und ausgeschiedenen Cholsäure hätte Beantwortung finden können.

Soviel ist jedoch entschieden, daß, soweit Taurocholsäure aus der verfütterten Gallensäure entsteht, diese auch am selben Tag zur Ausscheidung gelangt, denn nach 1,0 g Natriumcholat finden wir einen Abfall von 0,095 auf 0,047 (Reihe III), nach 2,1 g Natriumcholat von 0,104 auf 0,040 (Reihe IV).

Jedenfalls schließen wir aus unseren Reihen mit Bestimmtheit: **Cholsaures Natron wird zu einem sehr beträchtlichen Teil als Taurocholsäure mit der Galle ausgeschieden.** Diese Ausscheidung dauert längstens 24 Stunden an. Die Vermehrung steigt bis über das Doppelte der durchschnittlichen Taurinmenge.

Dieses Resultat rückt die eingangs mitgeteilten Ergebnisse von Kunkel und P. Spiro in ein unerwartetes Licht: Diese Forscher hatten bei achtfach vermehrter Zufuhr von Eiweiß, bezw. Schwefel im Eiweiß eine Steigerung des Gallenschwefels auf nur das Doppelte des ursprünglichen Wertes erhalten. Hier haben wir, ohne eine Spur Schwefel mehr zuzuführen, ganz dasselbe erzielt, indem wir cholsaures Natron reichten. Könnte nicht die vermehrte Eiweißzufuhr als solche, unabhängig von ihrem Schwefelgehalt, eine vermehrte Cholsäureproduktion bedingt haben? Daß eine vermehrte Eiweißzufuhr eine vermehrte Cholsäurebildung bedingt, sei es durch eine sekretorische Wirkung, sei es durch Zufuhr des zu ihrer Bildung nötigen chemischen Materials oder noch in anderer Weise, ist recht wohl denkbar. Jedenfalls wird durch diesen Zusammenhang zwischen Cholsäuresekretion und Eiweißzufuhr der Widerspruch verständlich, daß Kunkel und Spiro eine vermehrte Taurocholsäureausscheidung beobachteten, als sie das Eiweiß der Nahrung steigerten, während wir, die wir nur Cystin, das eine kleine, schwefelhaltige Bruchstück des Eiweißmoleküls, verfütterten, keine Vermehrung der Taurocholsäure auftreten sahen. Danach könnten die Arbeiten von Kunkel und Spiro vielleicht nur die Frage betreffen: Besteht ein Einfluß der Eiweißnahrung auf die Cholsäureproduktion in der Leber, speziell die Produktion der Taurocholsäure? Inwiefern sie eine Verwertung für die Frage der Taurinbildung gestatten, könnte erst nach weiteren einschlägigen Untersuchungen entschieden werden.

Die vorbereitenden Versuche hatten uns nun genügend aufgeklärt, um auf die ursprünglich gestellte Frage, mit Hilfe einer zweckmäßigeren Versuchsanordnung, von neuem zurückgreifen zu können.

V. Fütterung von Cystin neben Natriumcholat erhöht die Schwefelausscheidung durch die Galle.

Wir suchten nun die maximale Schwefelausscheidung nach Natriumcholatfütterung durch Darreichung von Cystin noch weiter zu steigern.

Versuchsreihe V.

Hund „A". Unter den gleichen Bedingungen wie in Reihe I bis IV.

Verfüttert	Datum	Tagesmenge ccm	Gewogenes $BaSO_4$ Kontrollanalysen	Gewogenes $BaSO_4$ Mittel	$BaSO_4$ auf die Gesamtmenge berechnet	S in der Gesamtmenge d. Galle	S in 24 Stdn. im Mittel
	11. 03						
1,0 g Cystin + 2,0 g cholsaures Natron	11.	130	0,2227 0,2146	0,2187	1,0935	0,1501	**0,150**
	12.	65	0,0791 0,0782	0,0787	0,3935	0,0540	**0,054**

Mit 2,1 cholsaurem Natron allein erhielten wir eine Schwefelmenge von 0,104 in 24 Stunden, mit 2,0 cholsaurem Natron plus 1,0 Cystin eine Schwefelmenge von 0,150. Die Steigerung ist also ganz unverkennbar.

Ein weiterer Versuch, unter den gleichen Bedingungen, gab ein ähnliches Resultat:

Versuchsreihe VI.

Hund „A". Unter den gleichen Bedingungen wie in Reihe I bis V.

Verfüttert	Datum	Tagesmenge ccm	Vereinigte Gallenmengen ccm	Gewogenes $BaSO_4$ Kontrollanalysen	Gewogenes $BaSO_4$ Mittel	$BaSO_4$ auf die Gesamtmenge berechnet	S in der Gesamtmenge d. Galle	S in 24 Stdn. im Mittel
	II. 03							
	13.	59		0,0549 0,0551	0,0550	0,2750	0,0378	**0,038**
	14.	66		0,0437 0,0436	0,0437	0,2185	0,0300	**0,030**
2 Tage	15. 16.	68 75	143	0,0998 0,0990	0,0994	0,4970	0,0682	**0,034**
1,0 g Cystin + 2,0 g cholsaures Natron	17.	116		0,1770 0,1802	0,1786	0,8930	0,1226	**0,123**
2 Tage	18. 19.	67 76	143	0,0860 0,0802	0,0831	0,4155	0,0571	**0,029**

Hier beträgt also die Schwefelmenge am Cystintage 0,123 g. Auch hier eine deutliche Steigerung, wenn auch nicht so stark, wie in Versuch V. Vielleicht erklären die umgebenden Normaltage diesen geringen Ausschlag, da die Normalwerte für die Schwefelausscheidung vom 13. bis 19. März überhaupt sehr niedere sind. Inbezug auf diese umgebenden Zahlen steht wenigstens die Reihe VI der Reihe V in keiner Weise an Beweiskraft nach.

Auch bei diesen beiden Versuchen kehrt die Schwefelausscheidung am folgenden Tage wieder völlig zur Norm zurück. Das spricht aber zunächst nur dafür, daß nach Aussetzen der Cholsäurezufuhr der Paarling für das zugeführte Cystin bezw. Taurin nicht mehr in genügender Menge vorhanden ist. Jedenfalls berechtigt es nicht zu dem Schluß, daß aus dem einen Gramm Cystin nicht mehr Taurin gebildet worden ist, als dem geringen Überschuß an Schwefel von etwa 0,02 bis 0,05 g entspricht. Man kann mit Weiss[10] daran denken, daß die Schwefelsteigerung bei der kombinierten Fütterung nur soweit geht, als Taurocholat gewissermaßen auf Kosten von Glykocholat gebildet wird. Weiss zeigte ja, daß bei Natriumcholatfütterung ein kleinerer Teil der Cholsäure nicht an Taurin gebunden ist. Es mag sein, daß nur dieser verfügbar wird. Danach wäre es begreiflich, daß bei unserer Versuchsanordnung der Schwefelvermehrung, auch bei kombinierter Fütterung, bestimmte enge Grenzen gezogen sind.

Ein abschließender Versuch sollte nun nach zwei Richtungen hin die Verhältnisse besser beleuchten. Einmal sollte, durch lang andauernde tägliche Fütterung mit cholsaurem Natron, wenn möglich, der Tauringehalt der Galle stark herabgesetzt werden, um dann nach Cystinfütterung einen möglichst großen Ausschlag zu erzielen. (Nach Weiss enthielte die Galle dann um ebensoviel mehr Glykokoll.) Zweitens sollte die Fütterung mit cholsaurem Natron auch hinterher noch eine Weile fortgeführt werden, um dem Cystin möglichst lange Gelegenheit zu geben, als Taurin in der Galle aufzutreten.

In dieser Absicht wurde ein zweiter Hund (Hund B) vier Tage mit je 2,0 g cholsaurem Natron gefüttert, bei sonst völlig gleich bleibender Kost. Dann überdies am fünften Tage mit 1,0 g Cystin und dann wieder drei Tage lang mit je 2,0 g cholsaurem Natron ohne Cystin. (Siehe Versuchsreihe VII.)

Versuchsreihe VII.

Hund „B". Gewicht 8,6 Kilo. Erhält täglich 200 g Fleisch, 150 g Reis, 30 g Kaseïn.

Verfüttert	Datum	Tagesmenge ccm	Vereinigte Gallenmengen ccm	Gewogenes $BaSO_4$ Kontrollanalysen	Gewogenes $BaSO_4$ Mittel	$BaSO_4$ auf die Gesamtmenge berechnet*)	S in der Gesamtmenge d. Galle	S in 24 Stdn. im Mittel
	III. 03.							
2 Tage	8. 9.	89 95	184	0,1365 0,1320	0,1343	1,343	0,1844	**0,092**
	[10.]	fehlt						
2 Tage	11.	80						
	[12.]	fehlt	195	0,1540 0,1566	0,1553	1,553	0,2132	**0,107**
	13.	115						
2,0 g cholsaures Natron	14.	123		0,1601 0,1746	0,1674	1,674	0,2299	**0,230**
2,0 g cholsaures Natron	15.	145		0,1388 0,1410	0,1399	1,399	0,1921	**0,192**
2,0 g cholsaures Natron	16.	132		0,1108 0,1184	0,1146	1,146	0,1574	**0,157**
2,0 g cholsaures Natron	17.	114		0,0833 0,0811	0,0822	0,822	0,1129	**0,113**
1,2 g Cystin 2,0 g cholsaures Natron	18.	160		0,1730 0,1716	0,1723	1,723	0,2366	**0,237**
2,0 g cholsaures Natron	[19.]	fehlt						
2,0 g cholsaures Natron	20.	136		0,1586 0,1550	0,1568	1,568	0,2153	**0,215**
2,0 g cholsaures Natron	21.	112		0,1000 0,1024	0,1012	1,012	0,1390	**0,139**
	22.	126		0,0981 0,1045	0,1013	1,013	0,1391	**0,139**
	[23.]	fehlt						
	24.	79		0,0550 0,0532	0,0541	0,541	0,0743	**0,074**
	25.	114		0,0748 0,0698	0,0723	0,723	0,0993	**0,099**

*) Zu den Analysen wurde je $^1/_{10}$ der Galle verwendet.

Die Zahlen geben hier eine so gute Einsicht in die bestehenden Verhältnisse, daß ich zu größerer Anschaulichkeit die Resultate graphisch darstelle.



Kurve.

Die Menge des Gallenschwefels steigt nach Zufuhr von 2,0 g Cholsäure wieder auf das Doppelte der Norm an, sinkt aber in den folgenden Tagen, trotz fortgesetzter Cholsäuredarreichung, etwa auf das vor der Cholsäurezufuhr gegebene Niveau ab. In diesem Moment setzt die Cystinfütterung ein, die Schwefelausscheidung steigt von neuem über das Doppelte an und erreicht am vierten Tage (21. III.) wieder einen Normalwert, ebenfalls trotz fortgesetzter Zufuhr von Cholsäure. Die Steigerung der Schwefelausscheidung entspricht am ersten Tage (14. III.) nahezu einer gänzlichen Überführung der Cholsäure in Taurocholsäure (gefundene Steigerung 0,13, berechnet 0,15 g Schwefel). Andererseits ergibt sich, unter der Annahme, daß die Schwefelausscheidung am 19. III., an dem die Bestimmung fehlt, ebenso groß war, wie an den Nachbartagen, eine Vermehrung der Schwefelausscheidung gegenüber der normalen Durchschnittszahl, wie sie ungefähr der verfütterten Cystinmenge (1,2 g) entspricht. Nach Aufhören der Chol-

säurefütterung bleiben, im Einklang mit den Beobachtungen der anderen Reihen (III bis VI), nur die physiologischen Schwankungen bestehen, und zwar etwa in derselben Breite wie beim ersten Hunde.

Die allmähliche Abnahme der Taurinmenge bei fortgesetzter Cholsäurefütterung, die wir auf Grund der Reihe IV vermuteten, ist durch diesen Versuch bewiesen. Der Organismus vermochte also nicht der Cholsäure dauernd die gleiche Menge Taurin zur Verfügung zu stellen, obwohl ihm mit der Nahrung stets etwa die gleiche Menge von Eiweißschwefel zugeführt wurde. Eine sichere Erklärung dieser Erscheinung steht noch aus. Weiss spricht, wie erwähnt, von einem Taurinvorrat der Leber, der sich erschöpft. Man könnte in diesem Sinn den Vorgang als Taurinerschöpfung bezeichnen, die selbstverständlich nur eine relative sein könnte, da der Eiweißzerfall erst mit dem Leben aufhört. Es ist aber auch denkbar, daß es sich nicht um Erschöpfung eines Taurinvorrates handelt, sondern etwa um eine Fähigkeit der toxisch und hämolytisch wirkenden Cholsäure auf irgend einem Wege Vorstufen des Taurins doch nur in beschränkter Menge frei zu machen.

Die eben besprochene letzte Reihe (VII) scheint mir deutlich alles Wichtige noch einmal vorzuführen, was sich aus unseren Versuchen ergibt. Sie zeigt in Übereinstimmung mit meinen früheren Versuchen:

1. Nach Fütterung mit Natriumcholat nimmt die Taurinmenge der Galle bei gleicher Eiweißnahrung um das Doppelte zu, d. h.: **Taurin steht dem Hundeorganismus reichlich zur Verfügung**, doppelt soviel, als er für gewöhnlich zur Gallensekretion braucht. **Cholsäure steht ihm nicht im Überschuß zur Verfügung.**

2. Dieser Taurinvorrat kann aber rasch erschöpft werden, d. h. bei längerer Fütterung mit cholsaurem Natron nimmt die Taurinvermehrung der Galle stetig ab, ja sie hört wohl schließlich ganz auf.

3. Durch Zufuhr von Cystin erhält der Organismus wieder den verloren gegangenen Taurinüberschuß. Das steht in Übereinstimmung mit den Versuchen von Weiss, der durch Zufuhr von Taurin dasselbe erreichte, was wir durch Cystin bewirkten.

Wie man sieht, unterscheidet sich die Cystinzufuhr in der Beeinflussung der Taurinausscheidung wesentlich von der nach Kunkel und P. Spiro bestehenden Wirkung der Eiweißzufuhr. Sie löst eine sofort nachweisbare, am gleichen Tage das Maximum

erreichende Vermehrung aus, während nach Eiweiß das Maximum erst am zweiten bis dritten Tage erreicht werden soll.

Besteht überhaupt die Vorstellung zu Recht, daß das Eiweiß diese Wirkung durch seinen Vorrat an Taurin bildenden Vorstufen bedingt, so muß geschlossen werden, daß der Zerfall des Nahrungseiweißes bis zur Bildung des Cystins oder einer gleich einfachen Vorstufe des Taurins beim Hunde zwei bis drei Tage lang dauert — eine Vorstellung, die mit unseren Erfahrungen über die Harnstoffbildung aus Eiweiß, die ungleich rascher verläuft, scheinbar in Widerspruch steht. Immerhin ist denkbar, daß die schwefelhaltigen Derivate des Eiweißmoleküls in den Geweben festgehalten bezw. anders verwendet werden, ehe es zur Taurinbildung kommt — eine Vorstellung, welche in der nach Cystinfütterung beobachteten längeren Nachwirkung eine Stütze finden mag.

Bei all diesen Schlußfolgerungen ist angenommen, daß die beobachtete Schwefelvermehrung in der Galle wirklich auf Taurin zu beziehen ist. Daß man unter gewöhnlichen Verhältnissen so gut wie ohne Fehler den Gesamtschwefel der Galle als Taurinschwefel ansehen darf, wurde oben gezeigt. Man könnte aber etwa auf den Gedanken kommen, Cystin werde als solches ausgeschieden oder aber eine der Vorstufen des Taurins in alkohollöslicher Form. Letztere Vermutung entzieht sich, da wir die im Organismus bei der Taurinbildung entstehenden Zwischenstufen nicht kennen, jeder Prüfung, erscheint aber wenig wahrscheinlich. Gegen die Annahme, daß Cystin oder eine gepaarte, alkohollösliche Cystinverbindung in der Galle auftritt, spricht das gänzliche Ausbleiben der Reaktion auf leicht abspaltbaren Schwefel in meinen Gallenproben.

Ein anderer Gedankengang könnte zu der Vermutung führen, daß das verfütterte Cystin nur durch einen erhöhten Eiweißzerfall zu vermehrter Taurinausscheidung Anlaß gebe, eine Vorstellung, die jedoch einmal durch die Tatsache hinfällig wird, daß sich der Einfluß des Cystin- und Eiweißzerfalls, wie erwähnt, zeitlich ganz verschieden gestaltet, aber auch schon darum zurückgewiesen werden muß, weil die durch Cystin erreichte Steigerung der Gallenschwefelausscheidung in meinem Fall, verglichen mit den Zahlen von Kunkel und P. Spiro, einen so gewaltigen, plötzlichen Eiweißzerfall zur Folge haben müßte, daß derselbe nicht ohne anderweitige toxische Symptome eintreten könnte. Daß eine solche Vorstellung überdies, bei einem auch normal als Verdauungsprodukt auftretenden Derivat des Eiweißes, kaum am Platze ist,

auch mit unseren Erfahrungen über Cystinurie im Widerspruche steht, braucht kaum betont zu werden.

Man darf somit als bewiesen ansehen, **daß das Cystin in der Tat vom Organismus in Taurin übergeführt werden kann und daß speziell das Taurin der Galle aus dem Eiweiß der Nahrung stammt.**

Interessant wird es sein, die Versuche in ähnlicher Richtung an einem Tiere zu wiederholen, das vorwiegend glykocholsaures Salz in seiner Galle enthält, etwa einer Ziege. Möglich, daß hier Cystinfütterung ohne weiteres zu dem Ergebnis führt, zu welchem wir beim Hunde erst auf einem Umweg gelangen konnten.

Wenn die Physiologen in einer früheren Periode die Bildung des Taurins aus Eiweiß darin begründet glaubten, daß auch das Eiweißmolekül oxydierten Schwefel enthielte, so haben die neueren chemischen Erfahrungen diese Auffassung durchaus in Frage gestellt, da der Nachweis einer solchen Schwefelgruppe gänzlich fehlt. Die Annahme eines solchen oxydierten Schwefels im Eiweiß ist bei den nun nachgewiesenen einfachen chemischen und physiologischen Beziehungen des nicht oxydierten Cystinschwefels im Eiweiß zum oxydierten Taurinschwefel der Galle vollends entbehrlich geworden.

Literatur.

[1]) Mörner, K. A. H., Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 207, s. a. die historische Übersicht von Friedmann, E., in: Ergebnisse der Physiologie 1902, **2**: „Der Kreislauf des Schwefels in der organischen Natur".

[2]) Friedmann, E., „Über die Konstitution des Cystins", Beiträge zur chem. Physiol. u. Path. **3**, 1 u. ff.

[3]) Bidder, F., und Schmidt, C., Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel. Mitau und Leipzig 1852.

[4]) Stadelmann, E., Der Icterus. Stuttgart 1891.

[5]) Kunkel, A., a) „Über das Verhältnis der mit dem Eiweiß verzehrten zu der mit der Galle ausgeschiedenen Schwefelmenge". Verhandlungen der königlich sächsischen Akademie der Wissenschaften, mathematisch-physikal. Klasse. Leipzig 1875, **27**, 232. b) „Über den Stoffwechsel des Schwefels im Säugetierkörper" u. „Eisen- und Farbstoffausscheidung in der Galle". Pflügers Archiv 1877, **14**, 344.

[6]) Spiro, P., „Über die Gallenbildung beim Hunde". Du Bois, Archiv für Physiologie 1880, Supplem.-Band 50.

[7]) Dastre, A., „Opération de la fistule biliaire", Archive de Physiologie 1890, **22**, 714.

[8]) Hammarsten, O., „Über eine neue Gruppe gepaarter Gallensäuren". Zeitschr. f. physiolog. Chemie **24**, 322.

[9]) Stadelmann, E., „Über den Kreislauf der Galle im Organismus". Zeitschr. f. Biologie. Jubelband f. W. Kühne 1896, 1 u. ff.

[10]) Weiss, A., „Zur Physiologie der Galle". Dissertation, Moskau 1883 (russisch). Autoreferat: „Ce que devient la bile dans le canal digestif". Bulletin de la société impériale des Naturalistes de Moscou 1884, **54**, 22.

XVII.

Über Crotin-Immunität.

Von Privatdozent Dr. **Martin Jacoby,**

Assistenten am pharmakologischen Institut.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.)

Wie die Untersuchungen zahlreicher Forscher gezeigt haben, kann das Studium der Phytotoxine Stützen für die Immunitätsforschung bieten. Deshalb schien mir die nähere Analyse der von Elfstrand zuerst studierten Lysinwirkung des Crotins von Interesse. Die Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte:

I. Die physiologische Konstitution des Crotinhämolysins und seine Beziehungen zum Antihämolysin.
II. Über die zelluläre Immunität gegen Crotin.
III. Über eine die Crotinwirkung hemmende Substanz in der Magenschleimhaut.

I.

Die Hämolyse der roten Blutkörperchen durch Crotin, wie sie durch die Untersuchungen Elfstrands*), Ehrlichs und Morgenroths**) und Lau's***) bekannt geworden ist, ist ein der Untersuchung sehr bequem zugängliches Phänomen, da das Gift schon in sehr kleinen Quantitäten bei niederer Temperatur rote Blutkörperchen des Kaninchens vollständig auflöst. Ferner handelt es sich um eine nicht zu labile und überdies leicht zugängliche Substanz, welche durch die Firma E. Merck in Darmstadt zu erhalten ist†).

---

*) Elfstrand, Über giftige Eiweiße, welche Blutkörperchen verkleben — Upsala 1897.

**) Ehrlich, Verhandl. d. Gesellsch. d. Charité-Ärzte 3. II. 1898 v. Berl. Klin. Wochenschr.

***) Lau, Über vegetabilische Blutagglutinine — Dissert. Rostock, 1901.

†) Die genannte Firma hat dem Institut in entgegenkommendster Weise eine größere Quantität des wertvollen Materials zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen möchten.

Das Crotinhämolysin gehört zu der großen Gruppe der Antikörper bildenden Gifte oder Rezeptorengifte. Das hat Morgenroth entdeckt, indem er durch Immunisierung einer Ziege ein im Reagensglas wirkendes Anticrotin darstellte. Zu ermitteln ist noch, ob das Crotin wie die Serumhämolysine aus zwei Substanzen besteht oder ob es wie die Bakterienhämolysine, das Tetanolysin und das Staphylolysin eine Substanz ist, deren Konstitution in großen Umrissen der des Diphtherie-Toxins entspricht, oder ob es ganz abweichende Verhältnisse darbietet.

Die Entscheidung der aufgeworfenen Frage ist keine ganz einfache. Jedoch sei gleich bemerkt, daß sich keine Anhaltspunkte für die Zusammensetzung des Crotinolysins aus zwei einzelnen Substanzen gefunden haben. Crotinlösungen sind nicht so labil wie die komplizierten Lysine. Haben sie durch längeres Erhitzen auf 55° oder durch kurzes Erhitzen auf 60° ihr Lösungsvermögen verloren, so gelingt es nicht, durch Serum von verschiedenen Säugerarten sie wieder wirksam zu machen. Selbstverständlich läßt sich die Zahl der negativen Komplettierungsversuche beliebig vermehren; ich habe eine ganze Reihe solcher Versuche ausgeführt. Die noch folgenden Darlegungen machen es aber unnötig, diese Versuche hier wiederzugeben. Die Herkunft des Crotins aus dem Pflanzenreiche macht die Existenz eines Komplementes, welches das Gift im tierischen Organismus vorfinden würde, nicht etwa a priori unwahrscheinlich; man könnte für dieses Pflanzengift ebenso an ganz unerwarteten Fundstätten ein Komplement antreffen, wie man es für das Kobragift im Lecithin gefunden hat. Warum aber die beim Kobragift planmäßig eingeschlagenen und erfolgreichen Wege hier nicht zum Ziel führen konnten, wird aus dem zweiten Abschnitt der Arbeit hervorgehen.

Unsere Komplettierungsversuche entbehren schon darum jeder Beweiskraft, weil die für diese Versuche künstlich abgeschwächten Crotinpräparate auch erheblich an Bindungsvermögen für Anticrotin und für Stromata von Zellen verloren hatten. Das hypothetische Komplement hätte also gar nicht in Funktion treten können, da der Immunkörper bei der Inaktivierung schon selbst geschädigt worden wäre.

Beweise für die Zusammensetzung des Crotinolysins aus einem Immunkörper und einem Komplement sind also nicht erbracht, die Nichtexistenz eines Komplementes ist natürlich überhaupt nicht zwingend zu erweisen. Dagegen konnte ich Analogieen zwischen der Konstitution des Crotinolysins und dem Bau des Diphtherietoxins aufdecken. Damit wird zunächst eine neue Stütze

für die Toxinnatur der Phytotoxine erbracht, ferner wird zum erstenmal für ein Lysin, das nicht ein Produkt des Bakterienstoffwechsels ist, eine Konstitution nach dem Typus des Diphtherietoxins dargetan. Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei ausdrücklich betont, daß die vorläufige Annahme eines einheitlichen Moleküls bei diesen Substanzen nicht ausschließt, daß man durch Spaltung eventuell zu zwei selbständigen Produkten kommen könnte, so wie man aus Eiweiß Albumosen darstellt. Wir müssen aber jedenfalls so lange von einer Substanz sprechen, bis die Annahme mehrerer Körper nötig wird.

Wie oben schon angedeutet wurde, führten zahlreiche Versuche, durch Abschwächung des Ausgangsmaterials zu Präparaten zu gelangen, bei denen das lytische Vermögen eine erheblich andere Veränderung als das Bindungsvermögen erfahren hätte, zu keinen sicheren Ergebnissen. Wie sich später herausstellte, kann das darin seinen Grund haben, daß das zur Verfügung stehende Crotin ein Gemenge von verschiedenen, nicht lösenden Crotinoiden und dem wirksamen Crotin darstellt. Bei der Abschwächung gehen nun vielleicht auch Crotinoide mit deren Bindungsgruppen verloren, und so kann es kommen, daß ein Präparat, das z. B. durch Verweilen im Brütschrank sehr wesentlich an lösender Wirkung eingebüßt hat, ganz parallel an Bindungsvermögen verloren hat. Selbstverständlich kann das aber auch anders zusammenhängen, und wir wollen uns daher nicht bei diesem nichts erledigenden Punkte aufhalten, sondern gleich zu den aufklärenden Momenten übergehen.

Diese Aufklärung wurde durch die Anwendung der Ehrlichschen Methode der partiellen Absättigung erreicht. Weil diese Methode nebst ihren Resultaten anscheinend dem Verständnis vielfach größere Schwierigkeiten bereitet als die übrigen Kapitel der Immunitätsforschung, so ist vielleicht eine etwas breitere Darstellung angebracht.

Um die Fragestellung scharf zu kennzeichnen, machen wir zunächst einmal die nicht zutreffende Annahme, das Crotin sei ein einheitlicher Körper, der mit dem Anticrotin reagiert, und bestimmen nach dem Vorgang von Ehrlich den Punkt der vollkommenen Neutralisation. Dabei setzen wir weiter zunächst voraus, daß das Anticrotinserum keine Stoffe enthält, die Crotin zerstören und das Crotin nicht Substanzen, welche anders wie durch Bindung das Anticrotin beeinflussen. Stehen sich nun Toxin und Antikörper gegenüber ungefähr wie Base und Säure, und dürfen wir ausschließen, daß saure Salze entstehen oder ähnliche

Komplikationen durch verschiedene Sättigung des Toxins mit Antitoxin eintreten, so müßten wir erwarten, daß bei partieller Absättigung des Toxins durch das Antitoxin, indem man bestimmte Bruchteile des zur Ganzsättigung notwendigen Serums zufügt, die Abnahme der Giftigkeit der zugefügten Serummenge proportional verläuft.

Davon ist nun keineswegs die Rede, wie die folgenden Versuche zeigen. Dieselben lassen sich natürlich viel feiner ausgestalten und würden dann wohl einen tieferen Einblick gestatten. Da jedoch ziemlich viel Kontrollversuche gleichzeitig durchgeführt werden müssen, so kann ein einzelner Arbeiter eine bestimmte Ausdehnung der Versuchsbreite nicht überschreiten. Für die Beleuchtung der prinzipiellen Punkte reichen aber unsere Versuche aus.

Jede Versuchsreihe bestand aus einer größeren Zahl von Einzelversuchen, die alle am gleichen Tage nebeneinander glücklich durchgeführt sein mußten, wenn der Versuch beweiskräftig sein sollte.

Es wurden benutzt:

1. als Indikator Blutkörperchen von Kaninchen;

Das Blut wird morgens aus der Carotis entnommen, defibriniert, mit 0,9proz. Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 5 Proz. gebracht, das Serum durch Zentrifugieren entfernt, die Blutkörperchen werden zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen, und dann wird wieder eine 5proz. Blutkörperchenkonzentration hergestellt.

2. als Lysin eine jedesmal frisch hergestellte Crotinlösung, von der eine für die ganze Versuchsreihe ausreichende Quantität hergestellt wurde;

3. als Antilysin ein durch Immunisierung von Kaninchen erhaltenes Serum, das entweder direkt nach der Entnahme benutzt wurde oder auf Eis ohne Zusatz von Antisepticis aufbewahrt war.

Es wurde bestimmt:

a) die geringste Quantität der Toxinlösung, welche vollständige Lösung von 1 ccm der Blutmischung in 24 Stunden herbeiführt. — Alle Proben hatten gleichen Kochsalz- und Wassergehalt, sie wurden 15 Minuten bei Brütschranktemperatur gehalten, dann in die Kälte gestellt.

Sehr bemerkenswert ist, daß die lösende Quantität derselben Giftlösung gegenüber den Blutkörperchen verschiedener Kaninchen sehr variieren kann. Für unsere Versuche ist das belanglos, weil für jede Versuchsreihe nur dieselbe und von einem Tiere stammende Blutmischung benutzt wurde. Die Tatsache ist aber von Interesse, weil dieser verschiedenen Disposition der Blut-

körperchen für das Crotin eine von Ehrlich*) bemerkte sehr verschiedene Disposition der Individuen derselben Spezies für das Crotin parallel geht**).

b) die Antilysinmenge, welche nötig ist, um ein vielfaches der einfach lösenden Dosis völlig unwirksam zu machen. — Dabei fällt schon auf, daß sehr viel mehr Serum nötig ist, um die Wirkung des Crotins gänzlich aufzuheben, als erforderlich ist, um die mehr oder weniger vollständige Lösung der Blutkörperchen zu verhindern.

Ferner wurden gleichzeitig größere Quantitäten der Giftlösung mit verschiedenen Mengen Serum gemischt, indem zu jeder Portion nur ein Bruchteil der zur völligen Schutzwirkung nötigen Dosis des Anticrotinserums zugesetzt wurde, und zwar in jeder Portion eine andere Menge. Die Gemische werden nach zwei Stunden untersucht.

Die Tabellen geben die Resultate von drei Versuchsreihen wieder:

Versuch 1.

Dosis completa für 1 ccm Blutmischung 0,1 mg Crotin. 1 mg Crotin wird durch 0,04 ccm Serum neutralisiert. Mithin sind zur Neutralisation von 100 mg Crotin 4 ccm Serum nötig.

Alle Portionen enthalten 100 mg Crotin; dieselben werden nach Zufügung des Serums durch Kochsalzlösung auf gleiches Volumen gebracht.

Antitoxingehalt in Proz. der zur Neutralisation nötigen Dosis	Im Gewicht zu erwartende Dos. complet.	Gefundene Dos. complet.	Verhältnis der gefundenen zu den zu erwartenden Werten
0,25 Proz.	997,5	1020	102 Proz.
1 Proz.	990	1350	136 Proz.
2,5 Proz.	975	150	15 Proz.
25 Proz.	750	240	32 Proz.
50 Proz.	500	140	28 Proz.
75 Proz.	250	80	32 Proz.

*) Therapie der Gegenwart 1901.

**) Wie Herr Geheimrat Ehrlich mir schreibt, hat das bereits Morgenroth bei seinen Crotinversuchen beobachtet. Ehrlich hat das in seinem Pariser Kongreß-Referat 1900 mit den Worten erwähnt: „Die Rezeptoren des Organismus können in einzelnen Fällen (Crotin, Hämolysine) sehr erheblichen Schwankungen unterliegen.“

Versuch 2.

Dos. compl. 0,075 mg Crotin. — 1 mg Crotin wird durch 0,075 ccm Serum neutralisiert. Zur Neutralisation von 100 mg Crotin sind also 7,5 ccm Serum nötig. Verwandt in jeder Portion wie oben 100 mg Crotin.

0,8 Proz.	1322	1400	105,7 Proz.
1,6 Proz.	1311	1600	121 Proz.
4 Proz.	1278	1200	94 Proz.
8 Proz.	1223	800	65 Proz.
20 Proz.	1066	200	19 Proz.
30 Proz.	933	170	18 Proz.
53,3 Proz.	627	0	0 Proz.

Versuch 3.

Dos. compl. 1 mg Crotin. — 1 mg Crotin wird durch 0,05 ccm Serum neutralisiert. Für 100 mg Crotin, die in jeder Portion verwandt wurden, also je 5 ccm Serum nötig.

1 Proz.	99	125	126,3 Proz.
2 Proz.	98	125	127,5 Proz.
10 Proz.	90	weniger als 63	weniger als 70 Proz.
20 Proz.	80	62,5	78,1 Proz.
40 Proz.	60	weniger als 11	wenig. als 18,3 Proz.
80 Proz.	20	weniger als 4¹/₄	wenig. als 21,2 Proz.

Die ersten Portionen Antilysin verringern also nicht die Lösungskraft des Crotins, sondern bringen eine deutliche Verstärkung zuwege. Dann wird durch weitere Anteile des Antilysins sehr schnell der Hauptanteil des Giftes neutralisiert, während eine große Restpartie Giftanteile beseitigt, die gar nicht mehr zur vollständigen Lösung von Blutkörperchen befähigt sind.

Soweit reichen die Resultate der Beobachtung. Ähnliches haben Ehrlich*), Madsen**), Neißer und Wechsberg***), sowie Arrhenius und Madsen†) bei Untersuchung des Diphtherie-Toxins, des Tetano- und des Staphylolysins gefunden.

---

*) Deutsche med. Wochenschr. 1898.
**) Zeitschr. f. Hygiene 1899.
***) Zeitschr. f. Hygiene 1901.
†) Festschr. zur Eröffnung des Serum-Instituts in Kopenhagen 1902.

Bei den Crotinversuchen kommt nur als neue Beobachtung die Steigerung der Giftwirkung durch minimale Antitoxindosen hinzu.

Wenn man sich die ganze Sachlage von allen Seiten überlegt, so scheint es mir, als ob auch die Erfahrungen am Crotin sich am ehesten auf der Grundlage der Annahme, die Ehrlich für das Diphtherietoxin gemacht hat, wonach man am Molekül haptophore und toxophore Gruppen unterscheiden müsse, einheitlich auffassen lassen. Besonderen Wert möchte ich auf die Beobachtungen legen, die auf die Existenz von Prototoxoiden hinweisen, also auf Toxoide mit größerer Affinität zum Antitoxin als das Toxin. Ohne die Annahme solcher Prototoxoide haben auch Arrhenius und Madsen nicht ihre so reichen Erfahrungen beim Tetanolysin erklären können. Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß die Anerkennung von Prototoxoiden die Annahme des springenden Punktes der Ehrlichschen Hypothese über den Bau der Toxine in sich schließt. Wer Toxoide zugibt, spricht sich damit dafür aus, daß das Toxin neben seiner Bindungsgruppe noch etwas anderes umfaßt, und rechnet auch mit der verschiedenen Affinität der ganzen und der gespaltenen Moleküle, acceptiert also alles Wesentliche der Auffassung von Ehrlich.

Die Beobachtungen über die eigentümlichen quantitativen Verhältnisse bei der partiellen Absättigung von Toxinen durch Antitoxine hat neuerdings Bordet*) in anderem Sinne wie Ehrlich gedeutet. Bordet nimmt im allgemeinen ein einheitliches Toxin an. Er stellt sich nicht vor, daß zugesetztes Antitoxin etwa mit dem Toxin derartig reagiere, daß ein entsprechender Toxinanteil abgesättigt wird, während der Rest, für den kein Antitoxin zur Verfügung steht, freibleibt; vielmehr stellt Bordet die chemisch durchaus berechtigte Vorstellung zur Diskussion, daß Antitoxin und Toxin verschiedene Verbindungen miteinander eingehen können. Steht nun wenig Antitoxin zur Verfügung, so bleibt nicht freies Toxin übrig, sondern es entsteht eine Toxin-Antitoxinverbindung, die giftig, wenn auch weniger giftig, als das freie Toxin ist.

Das Schema von Bordet kann aber die Beobachtung, daß die ersten Antitoxinanteile das Toxin nicht abschwächen, kaum befriedigend erklären. Es scheint, daß Bordet deswegen auch Toxoide anerkennt — wie wir oben auseinandersetzten, wäre damit der Kernpunkt der Ehrlichschen Hypothese gebilligt.

*) Ann. de l'Instit. Pasteur 1903.

Jedenfalls läßt sich die Giftsteigerung durch minimale Anticrotindosen am ehesten mit Ehrlichs Ansichten in Einklang bringen, was der Wichtigkeit dieser Frage halber noch besonders erläutert werden mag. Vernachlässigen wir zunächst die beobachtete Zunahme der Giftigkeit und diskutieren unsere Versuche unter der Annahme, daß die ersten Antitoxindosen keine Veränderungen des Giftwertes erzeugt hätten. Wenn wir dann mit Ehrlich annehmen, daß die ersten Antitoxinanteile mit Giftderivaten von hoher Affinität zum Antitoxin reagieren, die nur haptophore Gruppen, also keine charakteristische Giftwirkung besitzen, so ist es völlig begreiflich, daß der Giftwert der Lösungen durchaus ungeschwächt bleibt. Aber auch die tatsächlich beobachtete Steigerung der Wirkung ist wohl erklärlich. Wenn nämlich ein Gemisch von Toxoiden und Toxinen um die Rezeptoren der Zellen konkurriert, so wird ja, namentlich wenn die Affinität der Toxoide wie in unserem Falle eine größere ist, immer ein Teil der Rezeptoren von Toxoiden besetzt werden, und es wird mehr von dem Gemisch erforderlich sein, um die für die vollständige Lösung der Zellen erforderliche Besetzung von Rezeptoren mit Voll-Toxin zu erreichen*).

Durch diese Beobachtungen am Crotin werden auch Befunde am Abrin, die Hausmann**) im hiesigen Laboratorium vor zwei Jahren erhoben hat, dem Verständnis näher gebracht. Bei gewissen Abrinpräparaten, die verhältnismäßig weniger giftig als andere waren, konnte durch unvollkommenen Antiabrinzusatz eine Steigerung der Wirkung erzielt werden, bei hochgiftigen Präparaten nicht. Es ist sehr möglich, daß bei den weniger giftigen, älteren Präparaten Agglutinin allmählich in Agglutinoid übergegangen war, wie ich das früher auch schon für das Ricin auf Grund anderer Versuche angenommen habe.

Eine Steigerung der Wirkung durch geringe Dosen zerstörender Agentien ist auch für Zellwirkungen und für Fermente bekannt. Sicherlich handelt es sich hier vielfach um durchaus abweichende Verhältnisse. Daher will ich hier auf diese Frage nicht näher eingehen und nur bemerken, daß nach den Untersuchungen von

*) An dieser Stelle ist wohl von Interesse, eine Bemerkung von Ehrlich aus dem Jahre 1898 zu zitieren. (Deutsch. med. Wsch. 1898.) „Es ist auch möglich, daß die Prototoxoide unter gewissen Umständen imstande sind, direkt dadurch Heilung zu bewirken, daß sie vermöge ihrer stärkeren Verwandtschaft das Gift aus der Verbindung mit den Gewebselementen verdrängen."

) Hausmann, Diese Beiträge 1902, **2, 134.

Morgenroth und Korschun*) die Existenz von Fermentoiden wahrscheinlich geworden ist.

Von Interesse ist schließlich auch die Tatsache, daß in Toxin-Antitoxingemischen, in denen sich bei proportionaler Absättigung noch eine erhebliche Anzahl lösender Dosen finden müßte, tatsächlich viel weniger vorhanden sind. Man kann Gemische herstellen, von denen auch große Dosen überhaupt nicht mehr vollständig lösen, sondern nur noch die Blutkörperchen schädigen. Gegen die hier von Ehrlich als wirksam angenommenen „Toxone" wendet sich namentlich Bordets Kritik, und auch Arrhenius und Madsen versuchen, ohne sie auszukommen. Ein prinzipieller Punkt ist das, wie ich schon vorher ausführte, nicht. — Wirksame haptophore Gruppen sind jedenfalls noch vorhanden, wovon ich mich auch noch dadurch überzeugte, daß ich Kaninchen mit solchen Lysin-Antilysingemischen, die nicht mehr Zellen lösten, immunisierte, und dabei stark wirksame Antilysine erhielt.

II.

Wir haben schon im ersten Teil dieser Arbeit erwähnt, daß die vom Serum sorgfältig befreiten Blutkörperchen verschiedener Kaninchen sehr verschieden empfindlich gegen Crotin sind, daß es also eine celluläre Disposition gegen Crotin gibt. Das Crotin bietet aber auch die erwünschte Gelegenheit, eine zelluläre Immunität zu analysieren.

Elfstrand und Lau haben gefunden, daß gewisse Blutarten crotinfest sind. Ich habe mich davon überzeugt, daß hier eine wahre zelluläre Immunität vorliegt, insofern als gut gewaschene Blutkörperchen von Meerschweinchen und Hund durch sehr große Dosen Crotin nicht gelöst werden. Es ist möglich, daß diese Immunität nur der Ausdruck einer äußerst geringen und in diesen niedrigen Graden schwankenden Disposition ist, da in ganz vereinzelten Ausnahmsfällen riesige Dosen Crotin Hunde- und Meerschweinchenblutkörperchen zwar nicht schnell lösten, wohl aber die Lösung früher eintrat als die spontane Lösung der Blutkörperchen.

Es war nun wohl zuerst nötig, festzustellen, ob ein Unterschied zwischen den giftempfindlichen und den unempfindlichen Zellen insofern besteht, daß sie ein verschiedenes Bindungsvermögen für das Gift zeigen. Diese Untersuchung ist schon darum erforderlich, weil wenigstens für die komplizierter gebauten Lysine neben dem Rezeptorenmangel noch andere Möglichkeiten bestehen, die zelluläre Immunität bedingen können.

*) Korschun, Zeitschr. f. physiol. Chemie 1903.

Als Methode benutzte ich das von Sachs*) ausgearbeitete Stromaverfahren, mit dessen Hilfe dieser Autor festgestellt hatte, daß das Arachnolysin, das Blutkörperchen lösende Spinnengift, von den giftempfindlichen Zellen gebunden wird, von den unempfindlichen nicht. Man stellt sich in geeigneter Weise gleichzeitig Stromata aus empfindlichen und nicht empfindlichen Blutkörperchen dar und bringt sie für dieselbe Zeit und bei der gleichen Temperatur mit dem Gift zusammen. Dann wird die Flüssigkeit durch Zentrifugieren vom Rückstand abgetrennt und geprüft, inwieweit der Giftgehalt der Lösungen durch die Berührung mit den Stromata sich vermindert hat.

Die Darstellung der Stromata geschah ganz nach den sehr zweckmäßigen Angaben von Sachs, auf die hier deswegen verwiesen sein mag. Es wurden Hunde- und Meerschweinchenstromata mit Kaninchenstromata verglichen. Die Versuche fielen stets in gleichem Sinne aus.

Ein Versuch mit Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen sei hier als Beispiel wiedergegeben.

Versuch 4.

Aus je 10 ccm Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen werden die Stromata nach Sachs hergestellt, das Blut wird eine Stunde auf 54° erhitzt. — Die Kaninchenstromata werden mit 20 mg Crotin, die Stromata vom Meerschweinchen mit 10 mg Crotin zwei Stunden zusammengebracht.

Im Kaninchenabguß finden sich 3 Dosen, welche 2 ccm Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung (5 Proz.) vollständig lösen, im Meerschweinchenabguß mindestens 60 Dosen, obwohl die Kaninchenstromata mit der doppelten Dosis Crotin behandelt waren.

Der geringen Empfindlichkeit der Blutkörperchen von Meerschweinchen und Hund entspricht also ein geringes Bindungsvermögen der Stromata für das Gift oder ein geringer Rezeptorengehalt. Ähnlich liegt die Sache nach den Untersuchungen von Ehrlich und Morgenroth**) bei den Isolysinen, nach den Beobachtungen von Sachs beim Arachnolysin.

Es geht also in mehreren Fällen Rezeptorenmangel parallel der Unempfindlichkeit der Zellen. Jedoch ist Rezeptorenmangel nicht der einzige Weg, wie zelluläre Immunität zustande kommen kann. So kann das Schlangengift nach den Untersuchungen von Kyes und Sachs***) auch von unempfindlichen Blutzellen gebunden werden. Hier wird die Unempfindlichkeit nicht durch Rezeptoren-,

---

*) Diese Beiträge 2, 1902.

**) Berl. Klin. Wochenschr. 1900.

***) Berl. Klin. Wochenschr. 1902 u. 1903.

sondern durch Komplementmangel bedingt, indem der Zelle disponibles Lecithin nicht zu Gebote steht, welches bei den empfindlichen Zellen das als Immunkörper wirksame Schlangengift als Komplement unterstützt.

III.

Auf eine die Crotinwirkung hemmende Substanz bin ich bei Versuchen gestoßen, die eigentlich bezweckten, mit Hilfe von Pepsin-Salzsäure aus Crotinlysin Lysinoide darzustellen. Elfstrand hatte ermittelt, daß Pepsin-Salzsäure Crotin sehr schnell unwirksam macht. Zunächst konnte ich bestätigen, daß Crotin, welches einige Zeit mit Pepsin-Salzsäure gehalten war, nach der Neutralisation Blutkörperchen vom Kaninchen nicht auflöst, wobei natürlich Crotindosen, die etwa das Hundertfache der einfach lösenden Dosis betragen, nicht überschritten wurden. Man konnte nun daran denken, daß durch die Verdauung Crotinoide entstanden wären. Dann war zu vermuten, daß diese Giftderivate von den Zellrezeptoren gebunden würden. In diesem Falle war es möglich, daß die Blutkörperchen nach der Vorbehandlung mit dem Pepsin-Crotin auch auf Crotin nicht mehr reagierten. Die ersten Versuche in dieser Richtung schienen in dem angedeuteten Sinne zu sprechen. Fügte man nämlich zu dem Blutkörperchen-Pepsincrotingemisch wirksames Crotin, so lösten sich die Blutkörperchen auch nicht auf. Jedoch war der Grund ein anderer als der vermutete. Trennte man nämlich die mit Pepsincrotin behandelten Blutkörperchen durch Zentrifugieren von der überstehenden Flüssigkeit, so waren die Blutkörperchen wieder durch Crotin zu beeinflussen, während die Flüssigkeit von neuem Crotin unwirksam machen konnte. Man brauchte auch nicht etwa annehmen, daß durch Pepsineinwirkung aus Crotin Anticrotin entstanden wäre. Denn weitere Versuche lehrten, daß das Grüblersche Pepsin bereits in der Kälte und bei neutraler Reaktion Crotin an der Wirkung hindert.

Das Pepsinum purissimum Grübler ist zwar ein sehr reines Präparat; aber die Möglichkeit war doch vorhanden, daß eine Substanz, die ursprünglich sich nicht im Magen findet, erst bei der Darstellung des Präparates entstanden oder hereingekommen wäre. Deshalb habe ich Magenschleimhäute vom Schwein mit Hilfe der Buchnerschen Presse ausgepreßt. Es gingen in der Tat in die Extrakte Substanzen über, die das Crotin an der Wirkung hindern. Die fragliche Substanz ist kochbeständig, wirkt bei neutraler sowie bei schwach alkalischer oder schwach saurer Reaktion, sie ist weder mit dem Pepsin noch mit dem Antipepsin

[Weinland*)] der Magenschleimhaut identisch. Ihre Beziehung zum Crotin ist insoweit der des Anticrotins zum Crotin vergleichbar, als eine bestimmte Menge des Extrakts oder des Pepsinum Grüblers immer nur eine bestimmte Menge Crotin unwirksam macht, in einem Versuche z. B. 1 ccm Extrakt 10 mg Crotin. Die doppelte Dosis Crotin erfordert die doppelte Menge Extrakt. Es ist das nicht selbstverständlich, wie Bordet anzunehmen scheint, da ein solch einfaches Verhältnis weder für Fermentwirkungen Geltung hat, noch zutrifft, wenn es sich um den schädlichen Einfluß von Salzkonzentrationen auf Reaktionen handelt. Es könnte ja auch in der Magenschleimhaut eine Substanz vorhanden sein, welche in bestimmten Konzentrationen die Reaktion zwischen Blutkörperchen und Crotin hemmt, ohne daß die Crotinkonzentration direkt von Bedeutung wäre. Insofern verhält sich unsere Magensubstanz wie ein Antikörper im weiteren Sinne, wir haben ein koktostabiles Anticrotin vor uns. Ähnliche Substanzen hat man neuerdings mehrfach gefunden, z. B. eine koktostabile Antiurease [Moll**)], ein entsprechendes Antilab [Korschun***)]. Dieses Pseudo-Anticrotin hat nach verschiedenen Richtungen Interesse und bedarf noch weiterer Untersuchung. Ich erwähne nur die Beziehungen zum eigentlichen Antilysin. Ferner ist es von Interesse, inwiefern diese Hemmungssubstanz einen Schutz gegen die Resorption des Giftes vom Magen aus bietet. Zu untersuchen wäre auch die Verbreitung der Substanz im Tierkörper. Insbesondere eignet sich aber vielleicht eine solche kochbeständige Substanz zu Isolierungsversuchen.

*) Weinland, Zeitschr. f. Biologie 1902.
**) Diese Beiträge 1902, 2, 344.
***) Zeitschr. f. physiol. Chemie 1902.

XVIII.

Über die Wirkung des Ricins auf Fischblut.

Ein Beitrag zur Frage der natürlichen Immunität.

Von Dr. **Albert Fraenkel**-Badenweiler.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.)

Obgleich die Entdeckung der Serumantitoxine sowie jede weitere Erkenntnis über das Entstehen der erworbenen Immunität auch der Erforschung der natürlichen Giftfestigkeit stets neue Fragestellungen bietet, ist es bekanntlich bisher nur in wenigen Fällen gelungen, einen hinreichenden Einblick in den Mechanismus natürlicher Immunität zu gewinnen. Dabei hat sich vor allem herausgestellt, daß die Ursachen der natürlichen Giftfestigkeit in vielen Fällen von den Verhältnissen bei der künstlich erworbenen Immunität prinzipiell verschieden sind. Insbesondere für den Fall der natürlichen Immunität ist es a priori zu erwarten, daß das gleiche Ziel vom Organismus auch auf verschiedenen Wegen erreicht werden kann.

Jeder Einzelfall beansprucht deshalb Interesse. Ganz besonders geeignet zu einer Analyse der Giftfestigkeit erscheinen aber solche Fälle, in denen man das Problem mit Hilfe von Reagenzglasversuchen angreifen kann.

In dieser Richtung diente uns eine Angabe von Lau*) als Ausgangspunkt einer Untersuchung der natürlichen Immunität des Fischbluts gegen die agglutinierende Wirkung des Ricins. Lau teilt in einer Untersuchung über vegetabilische Blutagglutinine auf Grund mehrerer Reagenzglasversuche mit, daß

> „Ricin auf defibriniertes Fischblut keine agglutinierende Wirkung hat, daß das Fischblut eine recht auffallende Ausnahme inbezug auf die Wirkung des Ricins auf Blutarten bildet."

---

*) Über vegetab. Blutagglutinine. Inaug. Diss. Rostock 1901.

Unsere Versuche sind ausgeführt mit Ricin von E. Merck an Barben (Barbus fluviatilis Ag.) aus dem Neckar. Das Blut wurde den lebenden Tieren direkt aus dem Herzen entnommen. In den Reagenzglasversuchen wurde der Gehalt der Röhrchen an Salz und Wasser streng gleichgehalten, bei Barbenblut berechnet auf eine Isotonie von 0,41 Proz., wie wir sie selbst ausgewertet haben, bei Säugerblut von 0,9 Proz.

Wir konnten die Angabe Lau's zunächst bestätigen, wenn wir, wie er, zu 10 ccm 4proz. Barbenblut 10 mg Ricin zusetzten.

Steigerten wir aber die Dosis Ricin wie in dem nachfolgend mitgeteilten Versuche, so stellte sich heraus, daß die vom Säugerblut her bekannte Agglutination der Blutkörperchen auch beim Barbenblut eintritt; nur ist mehr Ricin notwendig, um die Wirkung zu erzielen, als beim Säugerblut. Das Barbenblut besitzt also keine absolute Immunität gegenüber dem Agglutinin des Ricingiftes, sondern nur eine relative.

Versuch vom 3. XII. 02.

No. 1.

Barbenblut 5 Proz.	Ricin (1proz. Lösg.)	Wirkung am folgenden Tage
5 ccm	1 mg	
5 „	2 „	keine Veränderung des Blutes
5 „	3 „	
5 „	4 „	
5 „	6 „	
5 „	8 „	
5 „	15 „	maximale Agglutination
5 „	20 „	do. do.
5 „	40 „	do. und geringe Hämolyse.

Wir sehen, daß bei einem Zusatz von 8 mg Ricin zu 5 ccm 5proz. Blut (0,25 ccm Originalblut) noch keine Veränderung eintritt, bei Steigerung der Ricinmenge auf 15 mg aber bereits maximale Agglutination. Im letzten Röhrchen der Reihe, in dem die größte Dosis, 40 mg Ricin, enthalten ist, schlägt die rasch eingetretene Agglutination nach einigem Stehen von selbst in Hämolyse um.

Auf die nahen Beziehungen von Hämolyse und Agglutination bei den Phytotoxinen hat Ehrlich in den „Schlußbetrachtungen"*) hingewiesen, und zwar in dem Sinne, daß nicht nur die eine der Phytalbumosen vorwiegend hämolytisch, die andere agglutinierend

*) Nothnagel, Spez. Pathol. u. Therap., 8.

wirkt, sondern auch daß das rein agglutinierende Ricin eine die Hämolyse bedingende Schädigung ausübt, und der Austritt von Hämoglobin nur durch die starke Verklumpung der Blutkörperchen verhindert wird. Baumgarten*) berichtet, daß diese beim Schütteln zutage tretende hämolytische Wirkung des Ricins nur bei hyperisotonischen Lösungen vorkäme. Wir konnten uns in einer Reihe von Experimenten überzeugen, daß beim Barbenblut auch ohne Schütteln in vorher agglutinierten Proben Hämolyse auftritt, doch nur bei großen Ricindosen, und zwar um so rascher und vollständiger, je größer die Dosis ist. Versuche wie der folgende stützen die Vorstellung, daß die Ricin-Hämolyse ein von der Agglutination nur graduell, nicht prinzipiell verschiedener Prozeß ist.

Versuch vom 4. XII. 02.
No. 2.

5 Proz. Barbenblut	Ricin mg		Wirkung
5 ccm	2,5		keine Veränderung
5 „	5,0		do.
5 „	7,5		do.
5 „	10		deutl. Agglutination
5 „	20	in Substanz zugesetzt.	max. Agglutination mit folg. geringer Hämolyse.
5 „	40		do. mit deutl. Hämolyse.
5 „	80		do. „ kompletter Hämolyse.

Für die Analyse der Beobachtung, daß das Fischblut im Vergleich zum Säugerblut eine wesentlich höhere Resistenz dem Ricin gegenüber aufweist, ergibt sich die Fragestellung von selbst: ist diese relative Immunität eine Besonderheit der Barbenblutkörperchen, ist sie eine celluläre, oder rührt sie von den übrigen Bestandteilen des Blutes her?

Um zunächst zu untersuchen, ob das Serum bei dem Zustandekommen dieser Immunität eine Rolle spielt, war zu prüfen, ob man durch Fischserum die Agglutinationswirkung des Ricins für Fischblut abschwächen kann. Es wurden zu gleichen Mengen Barbenblut steigende Mengen eines möglichst klaren Barbenserums zugesetzt, das durch Defibrinieren und längeres Stehen des Blutes in der Kälte oder durch Zentrifugieren gewonnen war. Schließlich wurden alle Röhrchen mit gleichen Mengen wirksamer Ricindosen beschickt.

*) Baumgarten, Mikroskop. Untersuchungen über Hämolyse im heterogenen Serum. Berl. klin. Wochenschrift 1901.

Versuch vom 5. II. 02.
No. 3.

Barbenblut 5 Proz.	Barbenserum	Ricin, nachher zugesetzt	Wirkung
5 ccm	0	20 mg	max. Agglutination
5 „	0,1	„	starke Agglut.
5 „	0,25	„	schwache Agglut.
5 „	0,5	„	keine Veränderung
5 „	0,8	„	
5 „	1,0	„	
5 „	2,0	„	

Solche Versuche wie der obige zeigten uns, daß Serumzusatz in steigenden Dosen in der Tat die Ricinwirkung mehr und mehr abstumpfen und schließlich gänzlich aufheben kann. Die agglutinationshemmende Wirkung des Serums trat in einer Reihe von Versuchen mit völliger Regelmäßigkeit ein. Dabei beobachtete man, daß der Serumzusatz zu Barbenblut auch imstande ist, die durch größere Ricindosen im Anschluß an die Agglutination eintretende Hämolyse abzuschwächen, beziehungsweise aufzuheben. Es treten somit auch hier deutlich die nahen Beziehungen von Agglutination und Hämolyse hervor, indem kleine Mengen Serum nur die Hämolyse, nicht aber die Agglutination, und erst etwas größere Mengen beide Wirkungen aufheben können. Auch nach diesen Versuchen erscheint die Hämolyse als eine direkte Steigerung und Fortsetzung des Agglutinationsprozesses, ohne daß freilich die Frage ihrer Beziehungen hiermit endgültig erledigt wäre.

Versuch vom 9. XII. 02.
No. 4.

5 Proz. Barbenblut	Barbenserum	Ricin, später zugesetzt	Wirkung
5 ccm	0 ccm	20 mg	max. Agglut. folg. Hämol.
5 „	0,1 „	„	„ „ „ „
5 „	0,25 „	„	„ „ keine „
5 „	0,5 „	„	keine „ „ „
5 „	0,8 „	„	„ „ „ „
5 „	1,0 „	„	„ „ „ „

Wie in den beiden zitierten Versuchen, No. 3 und 4, hat auch in einigen anderen der Zusatz von 0,5 ccm Serum 20 mg Ricin in ihrer agglutinierenden Wirkung auf 5 ccm 5-proz. Barbenblut (0,25 ccm Vollblut) jedesmal verhindert. Nehmen wir auf Grund von Versuchen wie No. 1 und 2 an, daß der gleichen

Barbenblutmenge bis zu 8 mg Ricin ohne Reaktion zugesetzt werden können, und bringen wir diese 8 mg in Abzug von den sicher agglutinierenden 20 mg, so heben immerhin 0,5 ccm Serum die Wirkung von 12 mg Ricin auf. 1 ccm Barbenserum entspricht also nach seinem Antiagglutininwert 24 mg Ricin. Dieser Befund bei Barbenblut steht nicht im prinzipiellen Gegensatz zu Erfahrungen mit Säugerblut, da Kobert*) und seine Schüler nachgewiesen haben, daß auch das Serum des normalen Säugetieres die Ricinwirkung hemmend beeinflußt. Nach eigenen Versuchen mit Katzenblut ist diese hemmende Kraft des Säugerserums aber viel schwächer als die des Fischserums.

Versuch vom 25. III.

No. 5.

5 Proz. Katzenblut	Katzenserum	Ricin in mg, nachher zugesetzt	Wirkung
5 ccm	0	10	max. Agglut.
5 „	0,1	10	„ „
5 „	0,4	10	„ „
5 „	0,5	10	starke „
5 „	0,8	10	deutl. „
5 „	1,0	10	deutl. „
5 „	1,5	10	Andeutung
5 „	2,0	10	Andeutung.

Die Feststellung des Antiagglutinin im Barbenserum genügt bereits für sich zur Erklärung eines größeren Grades von relativer Immunität. Daneben könnte aber auch den serumfreien Blutzellen eine höhere Resistenz gegenüber Ricin zukommen. Daß die Fischblutkörperchen durch das Gift überhaupt angegriffen werden, d. h. Rezeptoren im Ehrlichschen Sinne enthalten, geht schon aus den angeführten Versuchen hervor, welche die Agglutinierbarkeit erweisen. Dennoch wäre es möglich, daß ein relativer Mangel an Rezeptoren in den Fischblutkörperchen ihre höhere Resistenz mitbedingen könnte.

Dies könnten nur quantitative Versuche entscheiden. Wir haben uns darauf beschränkt, wenigstens das Bindungsvermögen der Blutkörperchen durch eine Anzahl Stromaversuche nach Sachs**) zu erweisen. Es ergab sich, daß Barbenstromata aus 10 ccm Blut imstande waren, 50 mg Ricin so fest zu binden, daß die aus dem Gemisch gewonnene abzentrifugierte Flüssigkeit weder Barbenblut noch Katzenblut agglutinierte.

*) Kobert, Verhandl. d. naturforsch. Gesellschaft zu Rostock 1900.

**) Diese Beiträge 2 (1902).

Versuch vom 10. III.

No. 6.

10 ccm Blut von Barben 20 Minuten auf 50° erwärmt, werden mit aqu. dest. lackfarben gemacht. Dann werden durch Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen mit 0,41 proz. Kochsalzlösung die Stromata der Blutkörperchen dargestellt. Es wird diesen Stromata 2,5 ccm 2 proz. Ricinlösung (= 50 mg) zugesetzt und die Mischung über Nacht stehen gelassen. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wird zur Untersuchung verwandt.

Zur Kontrolle wird eine an Salz- und Ricingehalt genau gleiche Ricinlösung verwendet, auf die keine Stromata eingewirkt haben.

5 Proz. Katzenblut	Ricintestflüssigkeit	Wirkung
5 ccm	0,1	deutliche Agglutination
5 „	0,2	starke „
5 „	0,3	maximale „
5 „	0,5	do.
5 „	0,8	do.
5 „	1,0	do.

5 Proz. Katzenblut	Stromaricingemisch	Wirkung
5 ccm	1,0	keine Veränderung.
5 „	2,0	
5 „	3,0	
5 „	4,0	

5 Proz. Barbenblut	Ricintestflüssigkeit	Wirkung
5 ccm	1	keine Veränderung
5 „	2	starke Agglutination
5 „	3	maximale „
5 „	4	do.

5 Proz. Barbenblut	Stromaricingemisch	Wirkung
5 ccm	3	keine Veränderung.
5 „	4	

Auch das Vielfache der mit Stroma behandelten Ricinlösung erreicht nicht mehr die agglutinierende Wirkung des Originalricingemisches. Das Stroma hat das Ricinagglutinin wahrscheinlich vollständig gebunden. Genaueres darüber müßten quantitative Versuche aussagen. Solche Versuche werden darüber aufklären, ob nur quantitative Unterschiede des Rezeptorengehaltes in den Blutkörpern von Fischen und Säugern bestehen, oder auch quali

tative, etwa in der Art, daß neben gemeinsamen Rezeptoren je ein spezieller vorhanden wäre*).

Für die Gegenwart gemeinsamer Rezeptoren spricht auch eine Umkehrung dieses Versuches. Läßt man nämlich Ricin auf die Stromata, die man aus Katzenblut gewonnen hat, einwirken, so kann man auch da nachweisen, daß durch diese Behandlung kleine Mengen Ricin gänzlich unwirksam werden, große Mengen aber in erheblicher Weise abgeschwächt sind, sowohl in ihrer Wirkung auf Katzen- als auf Barbenblut.

Die Frage, ob Säuger- und Barbenantiagglutinin, also auch Säuger- und Barbenagglutinin, sich decken, schien auf den ersten Blick entschieden zu werden durch weitere Versuche, die mit einem von Herrn Dr. Jacoby überlassenen Ricinantitoxin angestellt wurden, welches, aus einer Ziege gewonnen, über ein Jahr alt, von seiner ursprünglichen Hochwertigkeit nichts eingebüßt hatte. Wir prüften zunächst das Antitoxin an Katzenblut und stellten fest, daß 0,08 ccm Antitoxinserum die Agglutinationswirkung von 5 mg Ricin verhinderte. Mit diesem Titre des Säugerblutes prüften wir die Ricinwirkung auf Barbenblut in folgender Weise:

Versuch vom 1. III.
No. 7.

5 Proz. Barbenblut	Antiricin	Ricin	Wirkung
5 ccm	0	20 mg	max. Agglutination
5 „	1/4 Dos. d. Säugetitr.	20 „	fast max. „
5 „	1/2 „ „ „	20 „	deutliche „
5 „	3/4 „ „ „	20 „	keine Veränderung.
5 „	volle „ „ „	20 „	

Es braucht also nicht einmal den vollen Titrewert des Katzenantiricins, um die Ricinagglutination bei Barbenblut aufzuheben. Das Antiagglutinin für Säuger ist demnach ein ebenso starkes Antiagglutinin für Barben. Aber auch damit ist nur erwiesen, daß bei dem Immunisierungsprozeß der Ziege gegen Ricin die verschiedenen Rezeptorengruppen, auch die gegen Fischagglutinin schützenden, in das Serum gelangen. Die Frage der Identität des Säuger- und Fischricins ist auch durch solche Versuche nicht zu entscheiden. Wie wenig es angezeigt wäre, aus den bisherigen Beobachtungen bindende Schlüsse zu ziehen, und wie kompliziert

*) Über derartige Verhältnisse bei Hämolysinen s. Ehrlich u. Morgenroth. — 6. Mitteilg. Berl. klin. Wochenschrift 1902.

diese Verhältnisse liegen, erhellt aus einer Reihe von Versuchen, in denen wir feststellen wollten, ob die Ricinwirkung auf Säugerblut durch das Barben gegenüber als Antiagglutinin wirkende Barbenserum beeinflußt wird.

Wir ließen gleiche Mengen Ricin und steigende Dosen Barbenserum, kurze Zeit im Reagenzglas gemischt, auf Hundeblut wirken. Auch Ochsen- und Katzenblut zogen wir in den Bereich dieser Untersuchungen.

Von dem bequemer zugänglichen Kaninchenblut mußten wir absehen, es hat sich nämlich gezeigt, daß Barbenserum auf Kaninchenblut rasch und intensiv hämolytisch wirkt.

Versuch vom 2. II.
No. 8.

5 Proz. Hundeblut	Barbenserum	Ricin, nachher zugesetzt	Wirkung
5 ccm	0	8 mg	max. Agglut.
5 „	0,1	„	
5 „	0,2	„	
5 „	0,5	„	
5 „	1,0	„	
5 „	2,0	„	
5 „	2,0	0	keine Agglut. keine Hämolyse.

Ebensowenig wie die Wirkung größerer Ricindosen auf Hundevollblut konnte unser Barbenserum in Versuchen, wie der folgende, die agglutinierende Wirkung kleiner Ricindosen auf gewaschene Hundeblutkörperchen abschwächen oder gar aufheben.

Versuch vom 5. II.
No. 9.

5 Proz. Hundeblutkörperchen	Barbenserum	Ricin, nachher zugesetzt	Wirkung
5 ccm	0	3 mg	max. Agglut.
5 „	0,1	„	„
5 „	0,2	„	„
5 „	0,5	„	u. beg. Hämol.
5 „	1,0	„	max. Hämolyse.

Das gleiche Verhalten haben wir mit demselben Resultat bei Katzenvollblut und Katzenblutkörperchen festgestellt. Das Barbenserum hat also bei Säugerblutarten keine Andeutung der stark antiagglutinierenden Wirkung, die wir für Barbenblut kennen gelernt haben.

Barbenserum erweist sich trotz seiner deutlichen Antiagglutininwirkung für Barben als nicht antitoxisch für Kaninchen. Es wurden zunächst Kaninchen mit Barbenserum allein gespritzt. Sie blieben ohne nennenswerte Gewichtsabnahme am Leben. Darauf haben wir die giftige Dosis unseres Ricins für Kaninchen ausgewertet und gefunden, daß schon 0,4 mg pro Kilo Kaninchen unter erheblicher Gewichtsabnahme in 1 bis 2 Tagen tötet. Nach diesen Vorversuchen haben wir die Dosis letalis minima des Ricins mit dem Vielfachen derjenigen Menge von Barbenserum versetzt, die bei Fischblut die Ricinagglutination verhindert und das über Nacht stehen gelassene Gemisch den Tieren eingespritzt. Die Tiere starben ebenso rasch und unter den gleichen Erscheinungen wie die Kontrolltiere.

Nach all dem durfte es für die Frage der natürlichen Immunität der Barben gegen Ricin und für die Frage der Zusammensetzung des Ricingiftes von Interesse sein, zu untersuchen, wie sich die Barben selbst dem Ricin gegenüber verhalten. Mit beginnendem Frühling waren diese Versuche möglich, da man in Heidelberg die Fische im strömenden Neckar unter Bedingungen halten konnte, wo das Eingehen eines Fisches zu den größten Seltenheiten gehört.

Anfangs schien es, als ob die Barben gegenüber Ricin eine erhöhte Resistenz hätten, aber bald stellte sich heraus, daß es sich nur um eine bei Kaltblütern leicht verständliche längere Inkubationszeit des Giftes handelte und daß alle, selbst mit kleinen Dosen Ricin gespritzte Fische nach kürzerer oder längerer Zeit starben.

Die toxische Wirkung des Ricins für Barben war weder durch natürliches Antiagglutinin (Barbenserum) noch durch künstliches (Ricinantitoxin der Ziege) abzustumpfen. Das ergaben Versuche, in denen Ricin mit Barbenserum und Ricinziegenantitoxin in solchem Verhältnis gemischt wurde, daß es Barbenblut nicht mehr agglutinierte; die Barben wurden aber ebenso sicher und nach der gleichen Zeit getötet wie durch reines Ricin. Da wir bisher für das Allgemeinwirkungen bei Fischen hervorrufende Gift kein Antitoxin aufgefunden haben, so können wir über das Fischtoxin keine Aussagen machen.

Das Barbenserum ist jedenfalls sowohl bei Säugern wie bei Fischen ohne antitoxische Wirkung, schützt nur Blutkörperchen von Barben und nicht die von Säugern. Ob diese Wirkung durch die Gegenwart eines spezifischen Antikörpers zustande kommt oder in anderen Faktoren der chemischen und physikalischen Zu-

sammensetzung des Fischblutes bedingt ist, muß vorläufig unentschieden bleiben.

Schlußsätze.

1. Das Barbenblut wird durch Ricin in erheblich geringerem Grade agglutiniert als Säugerblut (natürliche relative Immunität).

2. Die größere Resistenz des Barbenblutes gegenüber Ricin beruht nicht auf Rezeptorenmangel der Blutkörperchen und ist jedenfalls zum Teil bedingt durch ein im Barbenserum enthaltenes starkes Ricinantiagglutinin.

3. Die Hämolyse durch Ricin hat nahe Beziehungen zur Agglutination; sie kann als eine Steigerung der letzteren angesehen werden.

4. Das Barbenserum, welches Blutkörperchen von Barben, aber nicht Säugetierblutkörperchen gegenüber stark antiagglutinierend wirkt, entbehrt der antitoxischen Wirkung.

XIX.

Ein Beitrag zur Chemie des entarteten Muskels.

Von phil. et med. Dr. **Anton Steyrer**, klinischem Assistenten.

(Aus der II. medizinischen Klinik in Berlin.)

Obwohl bereits öfter die Frage aufgeworfen wurde, wie sich entartete Muskeln chemisch verhalten, ist die Zahl der darüber vorliegenden Untersuchungen keine sehr große. Mac Donnel*) und Ogle**) haben den Glykogengehalt von Muskeln untersucht, welche von den sie versorgenden Nerven getrennt oder künstlich in verschiedener Weise inaktiviert worden waren, und konnten eine Zunahme desselben konstatieren. Später haben Chandelon***), Manché†) und Vay††) ähnliche Untersuchungen an Muskeln von Kalt- und Warmblütlern angestellt, welche im ganzen die Ergebnisse der genannten Beobachter bestätigen. Insbesondere hat eine Reihe exakterer Versuche, welche der letztgenannte Autor durchgeführt hat, die Frage über diesen Körper im Stoffwechsel des kranken Muskels zu einem gewissen Abschlusse gebracht.

Ferner wären hier noch zu nennen die Untersuchungen von Bischof†††), von Hoesslin*†), Krehl*††), Lindemann*†††), Rosenfeld†*), Katz††*), Rumpf und Schumm†††*) und R. Vogel§). Sie haben die Bestimmungen von Wasser, Fett,

---

*) American journal of the medic. sc. **46**, 1863.

) St. George Hospital reports **3, 1868.

***) Pflügers Archiv **13**, 1876.

†) Zeitschr. f. Biologie **25**, 1889.

††) Arch. f. ep. Path. u. Pharm. **34**, 1894.

†††) Bischof, Zeitschrift f. rationelle Medizin, 3 Reihe **20**, 1863.

*†) v. Hoesslin, Deutsches Arch. f. klin. Medizin **33**, 1883.

*††) Krehl, Deutsches Arch. f. klin. Medizin **51**, 1893.

*†††) Lindemann, Zeitschr. f. Biologie **38**, 1899.

†*) Rosenfeld, Centralblatt f. innere Medizin **22**, 1901.

††*) Katz, Arch. f. d. ges. Physiologie **63**.

†††*) Rumpf u. Schumm, Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilkunde **22**, 1901.

§) R. Vogel, Deutsches Arch. f. klin. Medizin 1902.

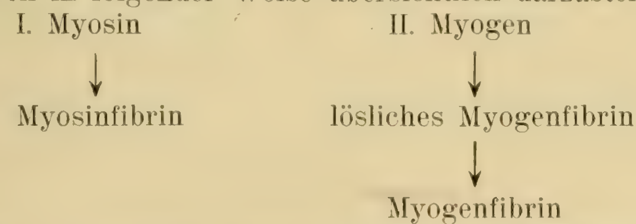
Trockensubstanz und Mineralbestandteilen an normalen und degenerierten Extremitäten- und Herzmuskeln zum Gegenstande. Auf ihre Details kann und braucht hier nicht näher eingegangen zu werden.

Der Zweck meiner Arbeit war, festzustellen, wie sich das quantitative Verhältnis der Eiweißkörper des degenerierten bezw. des inaktivierten Muskels zu denen des gleichnamigen normalen stellt.

Es ist das Verdienst v. Fürths*), die chemischen Eigenschaften der gerinnbaren Eiweißkörper des Muskelplasmas näher aufgeklärt zu haben; die von ihm vorgeschlagene Nomenklatur derselben ist auch später in der Literatur allgemein angenommen worden.

Während Halliburton**), welcher als erster systematische Untersuchungen über diesen Gegenstand anstellte, fünf verschiedene Eiweißkörper im Plasma unterschied, hat v. Fürth gezeigt, daß im Muskel des Warmblüters deren nur zwei vorhanden sind: das Myosin und das Myogen. Das Myosin ist ein globulinartiger Körper, der beim raschen Erhitzen zwischen 45° und 50° C gerinnt. Auch schon nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur tritt wenigstens teilweise Gerinnung ein, das Myosin verwandelt sich in Myosinfibrin. Löslich ist das Myosin in Neutralsalzlösungen; es ist durch Verdünnen mit Wasser und durch Dialyse fällbar, durch verdünnte Säuren und Neutralsalze aussalzbar. Aus seinen Lösungen wird es durch Halbsättigung mit Ammonsulfat niedergeschlagen.

Das Myogen koaguliert bei raschem Erhitzen zwischen 55° und 65°, ist durch Dialyse nicht fällbar und wird erst jenseits der Halbsättigung durch Ammonsulfat ausgesalzen. In destilliertem Wasser ist es löslich. Bei längerem Stehen verwandelt sich das Myogen zuerst in eine lösliche Modifikation, das lösliche Myogenfibrin, aus diesem in das unlösliche Myogenfibrin. Der Gerinnungsvorgang wäre nach v. Fürth in folgender Weise übersichtlich darzustellen:



In dem Spontangerinnen dieser beiden Eiweißkörper scheint mir nun die größte Schwierigkeit für die quantitative Bestimmung derselben zu liegen, da, wie ich mich überzeugen konnte, dadurch unter Umständen große Fehler erwachsen können; hierin liegt

*) v. Fürth, Über die Eiweißkörper des Muskelplasmas, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **36**, 250—257.

**) W. D. Halliburton. On muscle-plasma. Journ. of Physiol. 8°. 1888. 133 bis 202.

wohl auch die Ursache gewisser Differenzen in den Untersuchungsergebnissen Stewards und Sollmanns*), welche im allgemeinen die Angaben v. Fürths bestätigen. Nach v. Fürth enthält das Plasma des normalen Kaninchenmuskels, nach Maßgabe von Bestimmungen mittels fraktionierter Hitzefällung, ungefähr 80 Proz. Myogen und 20 Proz. Myosin.

Ich habe zunächst die Versuche des genannten Autors in dem Umfange wiederholt, als es mir notwendig schien, ein eigenes Urteil zu gewinnen, ob die gegebenen Methoden für meine Zwecke ausreichend seien.

Gewinnung des Muskelplasmas.

Bei der Gewinnung des Muskelplasmas habe ich mich fast vollkommen an das von v. Fürth angegebene Verfahren gehalten. Als Versuchstiere dienten ausnahmslos Kaninchen.

Dem Tiere wurde durch eine in die Vena jugularis communis eingebundene Glaskanüle ungefähr der dritte Teil seines Körpergewichtes an isotonischer Kochsalzlösung von 36° bis 40° C Temperatur zufließen gelassen, ohne daß der Ablauf des Blutes aus dem peripheren Teil der Vene gehindert wurde. Geschieht dies nicht allzu rasch, so treten selten irgendwelche bedrohliche Erscheinungen auf; bei noch guter Herzaktion wird sodann die Carotis durchschnitten, die Salzlösung bei gleichzeitiger Thoraxmassage in starkem Strome unter höherem Druck weiter zufließen gelassen. Das Tier verendet nun rasch unter heftigen klonisch-tonischen Krämpfen. Die aus der Arterie austretende Flüssigkeit ist schließlich hell fleischwasserfarben und hat, nach Fleischl gemessen, einen Hämoglobingehalt von weniger als 10 Proz. Sofort nach eingetretenem Tode wird das Abdomen eröffnet und in die Aorta abdominalis, sowie Vena cava inferior unterhalb des Abganges der Nierenarterien werden Kanülen in der Richtung des Blutstromes eingebunden. In die Aorta wird unter gleichzeitigem Beugen und Strecken, sowie unter Massage der unteren Extremitäten so lange isotonische Kochsalzlösung zufließen gelassen, bis die aus der Vene abfließende Flüssigkeit vollständig wasserklar erscheint; dieselbe enthält höchstens Spuren von in der Hitze koagulierbaren Eiweißes.

Die zu verarbeitenden Muskeln (es kamen die der unteren Extremitäten zur Verwendung) wurden, nachdem sie von Fett und Bindegewebe befreit waren, sofort mit dem Wiegemesser zu einem ganz feinen Brei zerschnitten und nach Zusatz einer geringen Menge isotonischer Kochsalzlösung mittels einer hydraulischen Presse, die einen Druck von 350 Atmosphären auszuüben gestattete, ausgepreßt. Das so gewonnene Plasma war opaleszent, von hellgelber bis rötlichgelber Farbe. Die Reaktion (Lackmus) war entweder ganz schwach alkalisch oder neutral und wurde nach längerem Stehen, besonders bei Zimmertemperatur, sauer. Die Zeit, welche vom Augenblicke des Todes der Tiere bis zur Verarbeitung des Plasmas verging, betrug meist nur ein weniges über eine halbe Stunde.

---

*) Steward u. Sollmann, The Proteids of muscle. Journ. of Physiol. **24**, 427 bis 459 (1899).

Bestimmung der relativen Mengenverhältnisse vom Myosin und Myogen.

Zur quantitativen Bestimmung von Myosin und Myogen bediente ich mich der schon erwähnten fraktionierten Hitzefällung. Für die ersten Versuche wurden die Koagulationstemperaturen mit 40°, 50°, 70° und 100° C angesetzt. Je 10 ccm Plasma wurden in gleich großen Zentrifugiergläsern von gleicher Wandstärke in ein genau auf die gewünschte Temperatur eingestelltes Wasserbad mit doppelten Wänden gebracht. Zur Kontrolle der Temperatur des Plasmas selbst wurde, da ein Eintauchen eines Thermometers in dasselbe nicht angängig ist, ein zweites, gleich großes Gefäß mit 10 ccm Wasser gleichzeitig eingesenkt; in diesem befand sich ein in halbe Grade geteiltes Thermometer, während ein zweites zur Ablesung der Badetemperatur außen eintauchte. Hatte die Temperatur im Kontrollgefäße die gewünschte Höhe erreicht, so wurde von diesem Augenblicke an das auszufällende Plasma unter stetem Umrühren nach 7 Minuten bei derselben gehalten. Die Temperaturschwankungen betrugen selten mehr als einen halben, niemals über einen ganzen Grad.

Die bei 40° und 50° ausfallenden Niederschläge setzen sich feinflockig, fast schleimig ab, während die Fraktionen von 70° und 100° gröber, kompakter ausfallen. Die Niederschläge wurden nun zur leichteren Reinigung mit Hilfe der Zentrifuge dekantiert und mit destilliertem Wasser chlorfrei gewaschen, die Waschwasser durch bei 110° getrocknete und gewogene Filter gegossen. Dieses Verfahren ist dem Waschen am Filter vorzuziehen, weil besonders das Myosin und der bei 40° ausfallende Niederschlag die Filterporen sehr rasch verstopft, wodurch die Reinigungsprozedur sehr in die Länge gezogen wird. Schließlich wurden die Niederschläge selbst aufs Filter gebracht, mit Alkohol und Äther durchgespült und bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bei meinen Untersuchungen am normalen Kaninchenmuskel (Ischiadicusmuskulatur), in dieser Weise ausgeführt, erhielt ich folgende Resultate:

Tabelle I.

Normaler Muskel	Niederschlag in Gramm	Niederschlag in Prozenten des Gesamteiweiß	Verhältnis des Myosin zum Myogen
I.			
Gesamt-Eiweiß 100° . . .	0,3623	100,00	
Myosin + Myogen 70° . .	0,3490	96,33	
Myosin 50°	0,0637	18,25	18:78
Myosinfibrin 40°	0,0061	1,68	
Albumin		3,67	

Normaler Muskel	Niederschlag in Gramm	Niederschlag in Prozenten des Gesamteiweiß	Verhältnis des Myosin zum Myogen
II.			
Gesamt-Eiweiß 100° . . .	0,5812	100,00	
Myosin + Myogen 70° . .	0,5675	97,65	
Myosin 50°	0,0978	16,83	17:81
Myosinfibrin 40°.	0,0092	1,58	
Albumin		2,35	
III.			
Gesamt-Eiweiß 100° . . .	0,4172	100,00	
Myosin + Myogen 70° . .	0,4098	98,23	
Myosin 50°	0,0889	21,31	21:77
Myosinfibrin 40°.	0,0000	0,00	
Albumin		1,77	

In diesen drei Versuchen gewann ich also Ergebnisse, welche mit denen von v. Fürth ziemlich gut übereinstimmen. Das Verhältnis von Myosin zum Myogen betrug im Durchschnitt: 19:79, bei v. Fürth 18:81.

Ich glaube jedoch an dieser Stelle noch einen Versuch anführen zu müssen, welcher bedeutend von den früheren abweicht. Es lag offenbar ein Versuchsfehler vor, der mir aber gerade für die Beurteilung des Wertes der Methode von Wichtigkeit erscheint. Es ergab sich nämlich an:

	Niederschlag in Gramm	Niederschlag in Prozent	Verhältnis von Moysin : Myogen
Gesamt-Eiweiß 100° . . .	0,5842	100,00	
Myosin + Myogen 70° . .	0,5588	95,66	
Myosin 50°	0,2090	35,78	36:60
Myosinfibrin 40°.	0,0824	14,11	
Albumin		4,34	

Die jedenfalls über der Fehlergrenze liegende Differenz des Verhältnisses vom Myosin zum Myogen (36:60) gegenüber dem oben angeführten (19:79 und 18:81) dürfte sich durch die Umstände, unter denen der Versuch ausgeführt wurde, erklären lassen. Sämtliche bisher angeführten Versuche wurden nämlich im Hochsommer gemacht; die Temperatur des Arbeitsraumes betrug oft mehr als 25° C. Während nun bei den in der Tabelle I angeführten Versuchen der Zylinder der Presse mittels einer Kühlschlange aus Bleirohr durch Eiswasser gekühlt und das Plasma sofort nach dem Abpressen verarbeitet worden war, mußte in den letztangeführten eine andere, weniger kräftig wirkende, nicht kühlbare Presse angewendet werden, was das ganze Verfahren verzögerte, so daß Preßmasse sowie Plasma mehrere Stunden einer verhältnismäßig hohen Temperatur ausgesetzt blieben. Dabei scheint sich nun ein Teil des

Myogens in Myogenfibrin, respektive in präformiertes Myogenfibrin umgewandelt zu haben, worauf schon der hohe Wert des bei 40° koagulierten Niederschlages hinweist. Geht man von dieser Voraussetzung aus und bringt das Gewicht dieses Niederschlages von dem bei 50° ausgefallenen in Abzug, was nicht ganz berechtigt ist, da sich bei langem Stehen auch Myosin in Myosinfibrin umgewandelt haben kann, so ergibt sich ein Gehalt von Myosin von 21,67 Proz. und ein Verhältnis von Myosin : Myogen = 22 : 74, was ungefähr der Norm entspräche.

Dieser Versuch bestätigt somit die Annahme v. Fürths, daß das Myogen sich nach einiger Zeit in präformiertes Myogenfibrin oder in Myogenfibrin umwandelt und ergänzt die von ihm zu diesem Zwecke ausgeführte Versuchsreihe insofern, als er zeigt, daß auch unter Umständen schon niedrigere Temperaturen als 40° C bei genügend langer Zeitdauer diese Umwandlungen zu bewirken imstande sind.

Angesichts dieser Tatsache tritt nun für die Beurteilung einer quantitativen Methode zur Bestimmung der Mengenverhältnisse von Myosin und Myogen die wichtige Frage heran: ist es möglich, diese Umwandlung zu verhindern, oder hat man wenigstens ein Mittel in der Hand, entscheiden zu können, ob Myogenfibrin in löslicher Form vorhanden ist oder nicht. Würde dasselbe bei 40° schon immer quantitativ ausfallen, so könnte man sich vor diesem Fehler schützen. Nach dem folgenden Versuche zu schließen, ist letzteres nicht der Fall.

Ein Kaninchen wurde in der gewöhnlichen Weise entblutet, das Plasma unter allen bezüglich der Temperatur nötigen Vorsichtsmaßregeln abgepreßt und in eisgekühlten Gefäßen aufgefangen. Die Temperatur des Arbeitsraumes konnte übrigens auf 10° C (Winter) gehalten werden. Vom Tode des Tieres bis zum Schlusse des Abpressens waren ungefähr 3/4 Stunden vergangen. Das Weitere ist aus der nun folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle II.

	Niederschlag in Gramm	Niederschlag in Prozent, auf den bei 70° ausfallenden Teil als 100 gerechnet
Port. I.		
A) 10 cm³ Plasma ergaben sofort nach dem Abpressen 7 Minuten auf 50° erhitzt	0,1249	23,04
B) Dasselbe Plasma dann 7 Minuten auf 70° erhitzt	0,5422	100,00
Entfallen auf Myogen	0,4173	76,96

	Niederschlag in Gramm	Niederschlag in Prozent, auf den bei 70° ausfallenden Teil als 100 gerechnet
Port. II.		
A) 10 cm³ Plasma ergaben sofort nach dem Abpressen 7 Minuten auf 40° erhitzt	0,0000	0,00
B) Dasselbe Plasma dann 7 Minuten auf 50° erhitzt	0,2045	37,10
C) auf 70° erhitzt	0,5513	100,00
Entfallen auf Myogen	0,3468	62,90
Port. III.		
A) 10 cm³ Plasma 5 Stunden lang bei 10° gehalten, bleiben klar.		
B) Dasselbe Plasma dann 7 Minuten auf 40° erhitzt, bleibt klar.		
C) auf 50° erhitzt . . . . (Bei 45° trat leichte Trübung ein, bei 47° flockiger Niederschlag.)	0,2207	40,23
D) auf 70° erhitzt	0,5486	100,00
Entfallen auf Myogen	0,3279	59,77

Aus diesem Versuche geht hervor, daß bei genügend raschem Verarbeiten des Plasmas sich die normalen Durchschnittswerte für Myosin und Myogen erzielen lassen. Portion I. 23 : 77. Portion II zeigt, daß verhältnismäßig kurzes Erwärmen auf 40° schon eine Umwandlung des Myogens hervorrufen kann, die jedoch unserer Beobachtung entgeht — die Flüssigkeit bleibt vollkommen klar — und sich erst durch den auffallend hohen Wert der Fraktion von 50° (37 : 63) verrät. Aus Portion III läßt sich nur schließen, daß auch längeres Stehen bei niedriger Temperatur ohne bedeutenden Einfluß auf die Gerinnung des Myogens beziehungsweise auf die Bildung von Myogenfibrin ist. Die Ergebnisse sind ungefähr dieselben wie in II.

Wenn aus dem bisher Gesagten auch hervorgeht, daß auf diesem Wege eine Methode, welche den strengsten Anforderungen einer quantitativen Analyse im allgemeinen entspricht, nicht geschaffen werden kann, so muß man andererseits doch auch zugestehen, daß die Fehlerquellen sich sehr einschränken lassen und bei vollständig gleichartiger Behandlung des Muskels doch Werte gefunden werden können, welche untereinander wenigstens vergleichbar sind. Nur von diesem Gesichtspunkte aus möchte ich die Resultate der nun folgenden Versuche, welche sich mit den Eiweißkörpern des kranken Muskels beschäftigen, betrachtet wissen.

Degeneration des Muskels, hervorgerufen durch Ausschaltung (Sektion) des zugehörigen Nerven.

Versuchsanordnung: Zu diesen Versuchen konnten nur große Kaninchen benutzt werden, da die Menge des aus dem degenerierten Muskel stammenden Plasmas sonst für die Bestimmungen nicht ausreichte. Von den in Betracht kommenden Nerven schien der Ischiadicus der geeignetste zu sein.

Ich ging unter aseptischen Kautelen mit einem Schnitte, der vom Tuber ischiadicum fast senkrecht gegen die Wirbelsäule gelegt war, durch die Haut ein. Am bloßgelegten Muskel findet sich in dieser Gegend meist mehr oder weniger deutlich sichtbar ein Sehnenstreifen, welcher in der gleichen Richtung verläuft. Diesem entsprechend durchtrennte ich den Muskel und hielt mich stumpf weiterpräparierend möglichst nahe am Trochanter. Es gelingt so, verhältnismäßig leicht und ohne nennenswerte Blutung auf den Nervus ischiadicus zu kommen. Gerät man jedoch etwas weiter nach aufwärts, so ist die Gefahr, die Vena cruralis zu verletzen, welche dort knapp neben dem Nerven verläuft, ziemlich groß. Der Ischiadicus wurde mit einer Hakenpinzette hervorgezogen und ein ungefähr 1 cm langes Stück desselben reseziert. Bei einiger Übung läßt sich diese Operation so schnell ausführen, daß eine Narkose gar nicht nötig ist. Muskel und Haut wurden durch Naht sorgfältig geschlossen, und letztere durch eine häufig zu erneuernde Schicht von Jodoformkollodium geschützt. Niemals zeigte sich eine Wiedervereinigung des durchtrennten Nerven. Die Enden desselben waren im Bindegewebe eingewachsen.

Im allgemeinen wurde die Operation, welche natürlich eine Lähmung des Beins zur Folge hat, sonst gut vertragen. Oft zeigten die Kaninchen kurz nach derselben schon Freßlust. Für die weitere Verarbeitung wurden nur Tiere benutzt, bei denen keine stärkere Blutung eingetreten war und der Wundverlauf sich als ganz glatt herausgestellt hatte.

Nach der Durchspülung mit Kochsalzlösung, welche in der schon oben geschilderten Weise vorgenommen wurde, fand sich bei gut gelungener Operation an der Einschnittstelle nur eine geringe Sugillation im Unterhautzellgewebe, auch manchmal noch an der Oberfläche des Muskels. Dieselbe ließ sich durch Spülen nicht mehr beseitigen; die betreffenden Muskelpartien wurden nicht mit in die Untersuchung einbezogen, ebensowenig wie der bei der Aufsuchung des Nerven verletzte Muskel. Zur Verarbeitung gelangten nur die vom Ischiadicus versorgten Muskeln der Beugeseite. Bei längerem Bestehen der Nervendurchtrennung ist gewöhnlich makroskopisch ein allerdings ziemlich geringer Unterschied gegenüber der gesunden Seite wahrnehmbar: das Volumen der Muskeln erscheint kleiner, sie fühlen sich schlaffer an. In den Fällen, wo dies nicht deutlich erkennbar war, wurde die mikroskopische Untersuchung angeschlossen. Dieselbe ergab immer

noch gesunde Muskelfasern, aber stets auch solche, bei denen die Querstreifung verwischt oder verschwunden, oder sogar scholliger Zerfall der Fasern eingetreten war.

Die elektrische Untersuchung wurde bei einem Tiere vorgenommen, das am 20. Tage nach der Operation stand. Über beiden Oberschenkeln wurden die Muskeln bloßgelegt und bei lebendem Tiere mit dem galvanischen Strome geprüft. Es zeigte sich herabgesetzte galvanische Erregbarkeit, etwas trägere Zuckung und (nicht immer) Überwiegen der Anodenschließungszuckung.

Die Gewinnung des Plasmas geschah, wie oben beim normalen Tiere bereits ausgeführt wurde. Es wurde so rasch als möglich und bei möglichst niedriger Temperatur gearbeitet. Auf ein Zerreiben des Muskels mit Bimsstein, wie es von v. Fürth ausgeführt wurde, habe ich immer verzichtet; doch wurde der Muskel in einigen Fällen mit etwas Chornatriumlösung ($\triangle$ = — 0,58 ° C) befeuchtet, und zwar so, daß auf normaler und degenerierter Seite dem Gewichte der Muskeln proportionale Mengen verwendet wurden.

Die Fällung der Eiweißkörper geschah in der Weise, daß gleiche Mengen Plasma von der gesunden und der operierten Seite in gleich starken Zentrifugiergefäßen gleichzeitig unter Beigabe des Temperaturkontrollgefäßes in das Wasserbad gesenkt wurden. Die weitere Behandlung geschah wie beim normalen Tiere. Es mag nur noch bemerkt werden, daß auch gleiche Mengen Waschwasser verwendet wurden. Auf die Fraktion bei 100° habe ich Verzicht geleistet, da es mir nur auf die Relation von Myosin und Myogen ankam.

Aus den in der Tabelle III unter Nervendurchtrennung angeführten Zahlen ist folgendes zu entnehmen. Sehen wir von dem Versuche No. 7 ab, so finden wir die Werte vom Myosin zum Myogen für den normalen Muskel zwischen 15:85 bis 26:74 schwankend. Dies geht über die Grenzen der bisher gefundenen Werte nach oben und unten hin etwas hinaus. Hält man die Zahlen der operierten Seite diesen entgegen, so findet man, daß hier in allen Fällen die relative Menge des Myosins die der gesunden Seite übertrifft, und zwar ist der niedrigste überhaupt gefundene Wert noch immer etwas höher als der höchste der gesunden Seite. Von Fall zu Fall verglichen ist der Prozentwert Myosin rund:

auf der gesunden Seite:	20,5	21	24	26	18	15
auf der operierten Seite:	27	28	32	39	33	30

Bei der vollständigen Gleichartigkeit der Bedingungen, unter denen das Plasma beider Seiten behandelt wurde, wird man also

Tabelle III. Nervendurchtrennung.

Nummer	Zeit der Operation	Zeit der Verarbeitung	Nach der Operation verflossene Zeit in Tagen	Zeitdauer vom Moment des Todes des Tieres bis zur Koagulation in Stunden	Temperatur des Arbeitsraumes	Normale Seite					Degenerierte Seite					Verhältnis Myosin : Myogen	
						7 Minuten bei 50° Niederschlag in Gramm	in Prozent	7 Minuten bei 70° Niederschlag in Gramm	Myogen in Prozent	Gramm Myogen	7 Minuten bei 50° Niederschlag in Gramm	in Prozent	7 Minuten bei 70° Niederschlag in Gramm	Myogen in Prozent	Gramm Myogen	Normal Myosin : Myogen	Degeneriert Myosin : Myogen
1.	15. VII.	23. VII.	8	4	23°	0,1080	21,13	0,5112	78,87	0,4032	0,1419	27,65	0,5142	72,35	0,3723	21 : 79	28 : 72
2.	30. IX.	11. X.	12	3	14°	0,1360	23,81	0,5711	76,19	0,4351	0,1524	31,76	0,4798	68,24	0,3274	24 : 76	32 : 68
3.	12. X.	17. X.	5	3	16°	0,1250	18,22	0,6862	81,78	0,5612	0,2131	32,52	0,6550	67,48	0,3319	18 : 82	33 : 67
4.	13. X.	20. X.	7	2	15°	0,0877	15,11	0,5802	84,89	0,4925	0,1776	30,13	0,5893	69,87	0,4117	15 : 85	30 : 70
5.	20. XI.	25. XI.	5	2½	12°	0,1692	26,34	0,6424	73,66	0,4732	0,2220	39,26	0,5658	60,74	0,3438	26 : 74	39 : 61
6.	18. XI.	22. XI.	4	2	14°	0,1150	20,50	0,5612	79,50	0,4462	0,1568	27,32	0,5741	72,68	0,4173	20,5 : 79,5	27 : 73
7.	21. X.	22. X.	1	2½	16°	0,1630	26,49	0,6152	73,51	0,4522	0,1196	22,83	0,5240	77,17	0,4044	26 : 74	23 : 77

Sehnendurchtrennung.

Nummer	Zeit der Operation	Zeit der Verarbeitung	Nach der Operation verflossene Zeit in Tagen	Zeitdauer vom Moment des Todes des Tieres bis zur Koagulation in Stunden	Temperatur des Arbeitsraumes	Normale Seite: 7 Minuten bei 50° Niederschlag in Gramm	in Prozent	7 Minuten bei 70° Niederschlag in Gramm	Myogen in Prozent	Gramm Myogen	Degenerierte Seite: 7 Minuten bei 50° Niederschlag in Gramm	in Prozent	7 Minuten bei 70° Niederschlag in Gramm	Myogen in Prozent	Gramm Myogen	Normal Myosin : Myogen	Degeneriert Myosin : Myogen
1.	16. XII.	23. XII.	7	2	9°	0,1338	17,45	0,7668	82,55	0,6330	0,1052	15,22	0,6915	84,78	0,5863	17 : 83	15 : 85
2.	5. I. 03	13. I.	8	2	10°	0,1213	20,26	0,5987	79,74	0,4774	0,1530	24,15	0,6335	75,85	0,5055	20 : 80	24 : 76
3.	10. I.	18. I.	8	2½	10°	0,1624	25,23	0,6437	74,77	0,4813	0,1511	28,62	0,5280	71,38	0,5619	25 : 75	29 : 71

Faradisation des Ischiadicus.

Nummer	Zeit der Operation	Zeit der Verarbeitung	Nach der Operation verflossene Zeit in Tagen	Zeitdauer vom Moment des Todes des Tieres bis zur Koagulation in Stunden	Temperatur des Arbeitsraumes	Normale Seite: 7 Minuten bei 50° Niederschlag in Gramm	in Prozent	7 Minuten bei 70° Niederschlag in Gramm	Myogen in Prozent	Gramm Myogen	Degenerierte Seite: 7 Minuten bei 50° Niederschlag in Gramm	in Prozent	7 Minuten bei 70° Niederschlag in Gramm	Myogen in Prozent	Gramm Myogen	Normal Myosin : Myogen	Degeneriert Myosin : Myogen
1.	9. IV.	9. IV.		1½	12°	0,0856	19,10	0,4481	80,90	0,3625	0,0614	11,08	0,5540	88,92	0,4926	19 : 81	11 : 89

nicht fehlgehen, wenn man aus diesen Zahlen den Schluß zieht, daß bei dem Muskel, welcher durch Trennung von seinem Nerven zur Degeneration gebracht wird, eine chemische Veränderung in dem Sinne vor sich geht, daß darin der Gehalt an Myosin größer wird, und zwar tritt diese Veränderung bereits frühzeitig, schon nach dem 4. Tage auf. Ein Schluß auf eine gesetzmäßige Abhängigkeit ihres Auftretens von der nach der Resektion verflossenen Zeit läßt sich allerdings nicht ziehen. Jedenfalls ist nach 24 Stunden eine derartige Änderung noch nicht nachweislich erfolgt, wie dies Versuch No. 7 lehrt. Die hier bestehende Differenz liegt wohl noch innerhalb der Fehlergrenze.

Durchtrennung der Sehne eines Muskels.

An großen ausgewachsenen Kaninchen wurde unter aseptischen Kautelen an der Vorderfläche des Oberschenkels ein Schnitt durch die Haut von 3 cm Länge parallel zur Längsachse des Knochens geführt. Hierauf wurde knapp am Kniegelenke die gemeinsame Sehne der Streckmuskeln des Oberschenkels erst stumpf von ihrer Umgebung und dem Knochen abpräpariert und dann auf der Hohlsonde durchschnitten. Zu einer nennenswerten Blutung kam es dabei nicht. Die Haut wurde hierauf durch Naht geschlossen. Das Bein stand natürlich jetzt in Beugestellung. Die Tiere zeigten nach der Operation bis zum Zeitpunkt der Verarbeitung stets Wohlbefinden. Eiterung trat niemals ein. Nach 7 bis 8 Tagen wurde die Entblutung und Durchspülung mit isotonischer Chlornatriumlösung in der bisher geübten Weise vorgenommen.

Die auf diese Weise von ihrem Insertionspunkt getrennten Muskeln — es sind dies der m. rectus femoris, vastus lateralis und medialis und musculus cruralis — befinden sich dann in einer Art von Kontraktionszustand, sie fühlen sich härter an als die der gesunden Seite. Die gemeinsame Sehne (das ligamentum patellare) ist in Bindegewebe eingebettet. Die mikroskopische Untersuchung zeigt in allen Fällen deutlich beginnende Degeneration. (Verwischung oder vollständiges Fehlen der Querstreifung eines Teiles der Fasern.)

Das Ergebnis der chemischen Untersuchung ist gleichfalls aus Tabelle III zu ersehen.

Der in Tabelle No. III an letzter Stelle angeführte Versuch bezieht sich auf Muskeln, die durch Reizung mittelst faradischen Stromes vom Nerven aus eine Stunde lang in tetanische Kontraktion gebracht worden waren.

Zu diesem Zwecke wurde wieder der Ischiadicus einer Seite in derselben Weise bloßgelegt, wie dies für die Resektion geschehen war. Durch einen unter dem Nerven durchgezogenen Streifen von Guttapercha wurde derselbe von der Umgebung isoliert. Als Elektroden dienten zwei voneinander isolierte hakenförmig gekrümmte 1 mm dicke Kupferdrähte.

Dieselben wurden unter dem Nerven in einem Abstande von 1 cm hindurchgeführt, wobei nach Möglichkeit eine stärkere mechanische Dehnung des letzteren vermieden wurde. Nur die dem Nerven unmittelbar anliegende Stelle des Drahtes wurde blank gelassen. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde das Ganze mit einem Bausch Watte, der in physiologische Kochsalzlösung getränkt war, bedeckt. Eine direkte Wirkung des Stromes auf den Muskel ist bei dieser Versuchsanordnung wohl ausgeschlossen. Der Nerv wurde nun bei leichter Narkose des Tieres durch einen faradischen Strom bis zur tetanischen Kontraktion der Ischiadicusmuskulatur eine Stunde lang gereizt, das Tier dann durch Entbluten getötet und mit isotonischer Kochsalzlösung durchgespült.

Im allgemeinen darf man wohl sagen: die Zellverbände leben als Ganzes, während die Zellen in der Regel einzeln absterben. Beim Muskel gibt es aber einen langsamen Tod, welcher scheinbar denselben Weg schreitet wie die physiologische Erregung und welcher alle Muskelprimitivbündel, die vom zugehörigen motorischen Nerven versorgt sind, unter Umständen gleichzeitig und in gleichem Maße trifft, das ist die Außerfunktionsetzung des Muskels nach Durchschneidung seines motorischen und trophischen Nerven. Diese Durchschneidung stellt bekanntlich ein Paradigma dar für die Folgen verschiedenartiger natürlicher Erkrankungen im Bereich des Nervensystems. Schwund der kontraktilen Substanz ist aber auch die typische Folge der Abtrennung des Muskels von seinen Ursprungs- oder Insertionspunkten, wodurch die Muskelfasern ihre normale Spannung und Dehnung einbüßen. Hier trifft im Gegensatz zur neurotischen Atrophie die Ursache für den Einbruch der Gewebsstruktur vielmehr Zelle um Zelle. Unter diesen Bedingungen verläuft die Atrophie bekanntlich rascher und erreicht höhere Grade.

Unter allen Umständen beruht die Atrophie der Muskelfasern bekanntlich nicht einfach auf Abnahme der kontraktilen Substanz, es bilden sich mehr oder weniger rasch mikroskopisch wahrnehmbare Veränderungen der Textur aus. Die zerfallende kontraktile Substanz wird schließlich ganz resorbiert, von dem Muskelprimitivbündel bleibt am Ende nichts zurück als das Protoplasma mit den Kernen. Während das keiner Funktion mehr dienende Protoplasmaprodukt seine Rolle im Organismus ausgespielt hat, bleibt das Protoplasma selbst mit den (eventuell gewucherten) Kernen, die „forming matter“, erhalten.

Mit Rücksicht auf die obigen allgemeinen Bemerkungen über einschlägige Modifikationen der Zellen im vielzelligen Organismus (Atrophie, Nekrose) ergab sich nun speziell mit Bezug auf den Muskel die Frage: Erfahren die Eiweißkörper des Muskelsaftes den gleichen chemischen Abbau bei längerer Erregung (Tetani-

sierung durch den faradischen Strom) vom Nerven aus, beim Degenerieren infolge von Durchschneidung des zugehörigen Nerven und endlich nach Durchschneidung der Sehne des Muskels selbst?

Die mitgeteilten Versuche geben, wie ich glaube, eindeutige Antwort, welche wohl von allgemein biologischem Interesse, speziell auch in Rücksicht der veränderten chemischen Eigenart unter pathologischen Bedingungen, ist. Bei der Tetanisierung des Nerven verliert der Muskelsaft das Myosin. Bei der Degeneration vom resezierten Nerven aus wird im Gegenteil Myosin im Muskelsaft aufgespeichert, bzw. es unterliegt wenigstens langsamer dem Schwunde. Beim Muskel, der von seinem Insertionspunkt abgelöst ist, bleibt das Verhältnis vom Myosin und Myogen annähernd das gleiche.

XX.

Zur Kenntnis der Eiweißbildung bei den Pilzen.

Von **Oskar Loew.**

In einer Arbeit über Stickstoffgewinnung bei den Pilzen hat F. Czapek*) kürzlich unter anderem mitgeteilt, daß Methylhydrazin als Stickstoffquelle für Aspergillus niger dienen könne. Diese Angabe schien mir angesichts der Giftwirkung der Hydrazine so auffällig, daß ich einige Versuche ausführte, welche das Resultat Czapeks in einem etwas anderen Lichte erscheinen lassen.

Zunächst überzeugte ich mich, daß Methylhydrazin ebenso wie andere Hydrazine giftig wirkt.

Schlammhaltiges Wasser, reich an niederen Tierformen, wurde mit 1 Promille und 0,1 Promille salzsauren Methylhydrazins versetzt, welches mit Soda genau neutralisiert war. Nach 24 Stunden waren dort alle, und hier die meisten Organismen, Nematoden, Rotatorien, Ostracoden, Copepoden, Infusorien und Flagellaten (Euglena viridis) tot. Nur die so zählebigen Monaden und einige Diatomeen lebten in letzterer Lösung noch zwei Tage länger. Auch die in diesen Lösungen befindlichen Algenfäden (Spirogyra und Mesocarpus) waren innerhalb zweier Tage abgestorben. Phanerogamen erschienen widerstandsfähiger; es dauerte zwei Wochen, ehe junge, 20 cm hohe Gerstenpflanzen in der neutralisierten 1 promilligen Lösung jenes Salzes abstarben. Indessen diese langsame Wirkung beruht jedenfalls darauf, daß in den Pflanzensäften Glykose vorhanden ist, welche sehr leicht mit Hydrazinen Glykosehydrazone bildet**).

Auch für Bakterien und Mycelpilze erwies sich Methylhydrazin als starkes Gift. Es wurden 10 ccm sterilisierte Bouillon mit 4 ccm einer genau mit Soda neutralisierten 1proz. Lösung von salzsaurem Methylhydrazin versetzt und mit Bac. pyocyaneus infiziert. Selbst nach zwölf Tagen bei 28° blieb diese Lösung ohne jede Spur von Entwicklung, während im Kontrollfall mit der äquivalenten Menge Salmiak eine reichliche Vegetation schon nach zwei Tagen zu bemerken war.

Es wurden ferner 6 ccm Bouillon mit 1 ccm jener Lösung gemischt und mit B. subtilis infiziert. Zugleich wurde die gleiche Mischung

*) Diese Beiträge **3**, 49.

**) Auch andersartige Umwandlungen sind nicht ausgeschlossen, denn das Methylhydrazin wird katalytisch auch durch Platinmohr beim Erwärmen unter Stickstoffentwicklung leicht zersetzt.

mit noch 0,6 g Rohrzucker versetzt und ebenfalls infiziert. Nach acht Tagen war in keinem Falle Entwicklung eingetreten. Als aber die Proben angesäuert und zwei Stunden im kochenden Wasserbade gehalten und nach dem Abkühlen von neuem infiziert wurden, ergab die mit Rohrzucker versetzte Lösung innerhalb dreier Tage eine reichliche Entwicklung, die andere Probe aber nicht. Offenbar war Rohrzucker invertiert und das Methylhydrazin in Hydrazon und, wie die eingetretene kanariengelbe Färbung verriet, zum Teil auch in Osazon verwandelt worden.

Da der im Staube der Luft weitverbreitete Bac. methylicus die vom Methan sich ableitenden Verbindungen, wie Methylamin, oxymethylsulfonsaures und ameisensaures Natron als Kohlenstoffquellen verwenden kann, wurde sein Verhalten auch gegenüber dem Methylhydrazin geprüft, allein selbst nach vier Wochen war keine Spur von Entwicklung in der 0,1 proz. Lösung zu beobachten, während in der Kontroll-Nährlösung mit Methylamin schon nach fünf Tagen eine Bakterientrübung eingetreten war.

Versuche mit Penicillium glaucum verliefen in gleichem Sinne. Eine Lösung, welche mit 0,4 Proz. Natriumazetat, 0,2 Proz. Monokaliumphosphat und 0,02 Proz. Magnesiumsulfat hergestellt worden war und das eine Mal als Stickstoffquelle 0,04 Proz. salzsaures Methylhydrazin, das andere Mal ebensoviel Salmiak erhielt und ohne vorheriges Erhitzen mit Penicillium-Sporen infiziert wurde, blieb dort steril, während hier bald reichliche Entwicklung eintrat. Dort blieb auch die Entwicklung aus, als noch 1 Promille Salmiak nachträglich zugesetzt und nochmals infiziert wurde*). Selbst als das Natriumazetat durch Rohrzucker ersetzt wurde, unterblieb jede Entwicklung, wenn die Lösung sofort nach ihrer Herstellung und bei Vermeidung jeden Erwärmens direkt mit Penicillium-Sporen infiziert wurde.

Wie ist es nun zu erklären, daß Czapek eine Pilzvegetation erhielt mit einer Nährlösung, welche 1 Proz. schwefelsaures Methylhydrazin und 3 Proz. Rohrzucker enthielt? Die Antwort auf diese Frage ist nicht schwierig. Czapek erhitzte vor der Infektion die Nährlösung 5 bis 7 Tage auf 28 °, um zu prüfen, ob die Flüssigkeit steril sei. Hierbei konnte aber infolge der sauren Reaktion der Nährlösung**) ein Teil des Rohrzuckers invertiert werden, was die sofortige Bildung von Glykosemethylhydrazon und Fruktosemethylhydrazon zur Folge haben mußte, von Körpern, welche, wenn überhaupt, doch sicherlich weit weniger schädlich auf die lebenden Zellen wirken, als das unveränderte Methylhydrazin. Bei einem sieben Tage dauernden Erwärmen auf 28 ° kann selbst bei nur schwach saurer Reaktion doch schon Inversion

*) Es ist wohl kaum nötig darauf hinzuweisen, daß Gifte bei sehr weit getriebener Verdünnung als Nährstoffe dienen können. Sogar Phenol kann so eine Kohlenstoffquelle für manche Mikrokokkenarten abgeben.

**) Die Salze des Methylhydrazins reagieren sauer. Czapek stumpfte zwar die Säure ab, ließ aber doch seine Lösungen schwach sauer.

von Rohrzucker stattfinden*). Ich habe den Versuch Czapeks, so genau als nach dessen Angaben möglich war, wiederholt und gefunden, daß in der Tat eine geringe Pilzmenge erzielt werden kann, wenn man die Lösung schwach sauer läßt. Ich erhielt in diesem Falle auf 50 ccm Nährlösung 0,032 g trockne Pilzmasse gegenüber 0,714 g im Kontrollversuche mit Ammoniumsulfat. Aber es blieb jede Spur von Entwicklung aus, wenn ich die Lösung, ohne sie zu erwärmen, völlig neutralisierte und mit den Sporen des Aspergillus niger infizierte. Daß meine Erklärung die richtige ist, geht auch daraus hervor, daß jede Entwicklung ausbleibt, wenn in der Lösung Czapeks der Rohrzucker durch Glycerin ersetzt wird. Hierbei ist eben der Übergang von Methylhydrazin in Hydrazone ausgeschlossen.

Noch einige Punkte seien hier kurz berührt. Czapek versucht, mit der elektrolytischen Dissoziationstheorie bald ein günstiges, bald ein ungünstiges Resultat zu erklären. So wirkt z. B. (p. 560) salzsaures Methylamin günstiger als essigsaures, weil es sich dissoziiert, Salmiak wirkt aber als Stickstoffquelle ungünstig, weil die „Chlorionen schon in den Anfängen das Wachstum der Pilzvegetation hemmen“ (p. 581). Eine Aufklärung, warum in jenem Falle die Chlorionen (vielmehr die freiwerdende Salzsäure) nicht schädlich wirkten, wäre von Interesse.

Wenn Czapek weiter schließt, daß oxyfettsaure Ammoniaksalze bessere Stickstoffquellen sind als fettsaure, so muß eingewendet werden, daß in beiden Fällen die Stickstoffquelle ja die gleiche ist, nämlich Ammoniak, und daß der verschiedene Effekt lediglich auf die als Kohlenstoffquellen**) in Betracht kommenden Säuren zurückgeführt werden muß, selbst dann, wenn diese in Abwesenheit von Zucker nur schlechte Kohlenstoffquellen darstellen. Wenn durch Zucker die Respiration kräftig unterstützt wird, können manche Verbindungen leichter der partiellen oder totalen Verbrennung unterliegen als in Abwesenheit von Zucker. Bei Abwesenheit von Zucker werden ferner alle jene Körper eine

*) Nach Degener kann sogar das so schwach saure Asparagin invertierend auf den Rohrzucker wirken.

**) Aus einer Stelle geht deutlich hervor, daß Czapek das auch selbst erkennt; dennoch führt er nachher wieder verschiedene Ammoniaksalze als ebensoviel verschiedene Stickstoffquellen an. Mellithsaures Ammoniak wird als eine gute, benzoesaures Ammoniak als eine schlechte Stickstoffquelle bezeichnet. Bei letzterem Salz übt jedoch die durch die saure Reaktion in Freiheit gesetzte Säure eine Giftwirkung aus. Da Salizylsäure leichter oxydierbar ist als Benzoesäure, so erklärt es sich, daß „salizylsaures Ammoniak eine bessere Stickstoffquelle ist als benzoesaures“.

unvollständige Ausnützung ihres Stickstoffs ergeben, bei denen wie beim Glykokoll die Anzahl der Kohlenstoffatome zu gering im Verhältnis zu der der Stickstoffatome ist; dieses muß größer sein als 4 : 1, da die Eiweißbildung allein schon dieses Verhältnis fordert, die Respiration und Membranbildung aber relativ noch mehr Kohlenstoff erfordert.

Wenn ferner in vielen Fällen — durchaus nicht in allen! — Aminosäuren besser verwertbar sind als Ammoniaksalze, so darf nicht ohne weiteres gefolgert werden, daß „die Bildung von Aminosäuren die erste Phase bei der Eiweißbildung" vorstelle. Jener Unterschied könnte ja auch dadurch bedingt sein, daß manche Aminosäuren nicht nur eine Stickstoffquelle, sondern zugleich eine sehr geeignete Kohlenstoffquelle abgeben, leicht der Oxydation unterliegen, usw. Eine Verallgemeinerung jener Schlußfolgerung geht wohl nicht an. Meine Beobachtungen stimmen mit denen O. Emmerlings*) überein, welcher sich folgendermaßen äußert: „Aus meinen Versuchen geht hervor, daß durchaus nicht alle Aminosäuren von gewissen Schimmelpilzen als Stickstoffquellen benutzt werden können, daß sich selbst sehr nahestehende Körper sehr verschieden verhalten, und daß die Pilze selbst auch untereinander große Verschiedenheiten zeigen." In der Tat zeigen ja viele Pilze sogar bei optischen Antipoden derselben Körper einen beträchtlichen Unterschied. Will man erforschen, welches die einfachsten zur Eiweißbildung tauglichen Atomgruppierungen sind, so muß man sich meines Erachtens einerseits an einen möglichst-anspruchslosen Pilz, andererseits an die niedersten organischen Verbindungen halten. Ich habe vor Jahren diese Verhältnisse erörtert**), und diese Ausführungen werden nicht immer ignoriert werden können.

) Berichte der deutschen chem. Ges. **35, 2289.

**) Vergl. Kap. 6 bis 8 in meiner Schrift: Die chemische Energie der lebenden Zellen.

XXI.

Über das biologische Verhalten von Nerol, Geraniol, Cyclogeraniol.

Von Dr. med. **Herm. Hildebrandt.**

Unlängst ist seitens verschiedener Chemiker auf das Vorkommen eines neuen, Nerol*) genannten, aliphatischen Terpenalkohols in ätherischen Ölen**) hingewiesen worden, der die gleiche Zusammensetzung hat wie Geraniol $C_{10}H_{18}O$ und ihm außerordentlich ähnlich ist. Der Geruch des Nerol soll feiner und rosenartiger sein als der des Geraniol. Im übrigen unterscheidet sich das Nerol vom Geraniol durch den etwas niedriger liegenden Siedepunkt 225° bis 227° — gegen 229° bis 230° für Geraniol — und durch die Eigenschaft, mit Chlorkalzium keine feste Verbindung einzugehen. Nerylazetat und Nerylformiat riechen den entsprechenden Estern des Geraniols ähnlich.

Die Unterschiede bezüglich des spezifischen Gewichtes, des Drehungsvermögens, des Brechungsexponenten sind so gering, daß auf Grund der Bestimmung der Konstanten eine Unterscheidung der Verbindungen nicht möglich ist.

Ich wollte ermitteln, ob in biologischer Hinsicht ein Unterschied zwischen den beiden Alkoholen besteht. Durch das Entgegenkommen der Firma Schimmel & Co. gelangte ich in den Besitz einiger Gramm Nerol, welches allerdings nicht ganz frei von Geraniol war. Gleichzeitig lag mir das neuerdings von Haarmann u. Reimer dargestellte Cyclogeraniol vor, das ringförmige Isomere des Geraniols, das ich der genannten Firma verdanke. Versuche, welche ich an weißen Mäusen mit subkutaner Injektion der mit oleum olivarum hergestellten Lösung der Stoffe anstellte, ergaben folgendes: Wenige Minuten nach Injektion von 0,05 g Nerol und Geraniol zeigen sich Vergiftungserscheinungen, taumelnder Gang, Zurseiteliegen, einige Stunden anhaltende Be-

*) A. Hesse u. Zeitschel, Journ. f. pr. Ch. 502 (1903), v. Soden u. Zeitschel, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **36**, 265 (1903). Schimmel, Bericht. April 1903. 55 u. 59 ff.

**) Dem Neroli-Öle und dem Petitgrain-Öle.

täubung, ev. Tod. Ein Unterschied in der Art und Intensität der Wirkung war auch bei Anwendung kleinerer Dosen nicht zu beobachten.

Beim Cyclogeraniol hatte die Dosis 0,05 g keinerlei Wirkung; erst die vierfache Dosis, nämlich 0,2 g, rief einen intensiven Betäubungszustand hervor. Es erinnert diese Tatsache an das Verhalten der entsprechenden Aldehyde, des Citral und seines cyklischen Isomeren.*)

Ich habe gleichwohl entscheiden können, daß Nerol nicht identisch ist mit Geraniol. Nach Darreichung von Geraniol an Kaninchen habe ich bereits früher dieselbe zweibasische Säure $C_{10}H_{14}O_4$ erhalten, welche ich zuerst als hauptsächlichstes Stoffwechselprodukt des zugehörigen Aldehyds Citral**) nachwies. Das isomere Cyclocitral liefert diese Säure nicht, ebensowenig das Cyclogeraniol; im Harn der Tiere konnte ich nur gepaarte Glykuronsäuren nachweisen. Das bisher gewonnene und mir vorliegende Nerol enthält als Beimengung Geraniol; ich bin daher so verfahren, daß ich am gleichen Tiere die gleichen Mengen Nerol (2 g) und — eine Woche später — Geraniol innerlich verabfolgte. Die Verarbeitung der Harne fand in der früher angegebenen Weise statt. Aus dem nach Darreichung von Nerol gewonnenen Harne konnte 0,05 g der zweibasischen Säure erhalten werden, während ich nach Darreichung von Geraniol 0,7 g der Säure erhielt. Namentlich im Falle des Nerol waren im Harne reichliche Mengen gepaarter Glykuronsäuren nachweisbar. Die nebenher auftretende kleine Menge der zweibasischen Säure muß ich auf die Verunreinigung mit Geraniol zurückführen und halte es für sicher, daß im Nerol ein vom Geraniol abweichender Körper vorliegt. Betreffs der Konstitution der zweibasischen Säuren bin ich bereits auf Grund früherer Untersuchungen zu dem Ergebnis gelangt, daß nicht eine der beiden endständigen Methylgruppen, sondern die am Kohlenstoffatom „5" sitzende Methylgruppe zu COOH im Organismus oxydiert worden ist; dagegen mußte ich die Frage nach der Lage der doppelten Bindungen offen lassen. Herr Prof. C. Harries zu Berlin, dem ich einige Gramme der neuen Säure seinerzeit zur Verfügung stellte, hat durch seine Untersuchung meine Auffassung bestätigen können und mir folgendes mitgeteilt: „Das Präparat schmolz direkt abgelesen bei 175 bis 180° nach dem Umkristallisieren aus Methylalkohol — 1 g wird von etwa 12 ccm davon bei Siedetemperatur aufgenommen — wurde

*) Arch. f. experim. Pharm. u. Path. **46**, 266 (1901.)
) Das. **45, 121 (1901.)

der Schmelzpunkt bei 192 bis 194° konstant." Die Kristalle bilden kleine derbe reinweiße Prismen. Nach der Entstehung der Säure aus Citral, der Elementaranalyse und ihrem Verhalten gegen Brom kommt ihr die Formel einer Dikarbonsäure mit zwei Äthylen-Bindungen zu:

entweder **Ia**: $$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3}{CH_3}{>}C = CH.CH_2.CH_2.\underset{\displaystyle COOH}{C} = CH.COOH$$

bezw. **Ib**: $$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3}{CH_3}{>}C = CH.CH_2.CH = \underset{\displaystyle COOH}{C}.CH_2.COOH$$

oder **IIa**: $$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3}{COOH}{>}C = CH.CH_2.CH_2.\underset{\displaystyle CH_3}{C} = CH.COOH$$

bezw. **IIb**: $$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3}{COOH}{>}C = CH.CH_2.CH = \underset{\displaystyle CH_3}{C}.CH_2COOH$$

Zugunsten der Formel Ia resp. Ib konnte sehr leicht entschieden werden durch folgenden Versuch: Die Säure wurde mit Ammoniak eingedampft; dabei entstand ein festes Ammoniumsalz. Dasselbe wurde mit viel Zinkstaub verrieben und im Rohr erhitzt. Ein hineingehaltener, mit verdünnter Salzsäure befeuchteter Fichtenspan nahm dabei eine intensive kirschrote Färbung an*). Hierdurch ist zur Evidenz bewiesen, daß die Säure der Bernsteinsäurereihe angehört; denn nur eine solche kann bei der Zinkstaubdestillation des Ammoniumsalzes ein Pyrrolderivat ergeben, welches die Fichtenspan-Reaktion so intensiv anzeigt.

Dann wurde noch die Entscheidung der Frage über die Konstitution nach Ia oder Ib versucht. Zu dem Zwecke wurde die Säure in wässeriger Lösung mit 2½ proz. Natriumamalgam energisch behandelt, hierbei blieb sie aber ganz unverändert; sie konnte quantitativ wieder gewonnen werden. Daraus geht nach meiner Meinung hervor, daß eine Säure der Formel Ib vorliegt; denn eine Säure der Formel Ia gehört der Maleïn- oder Fumarsäurereihe an und müßte sich durch Natriumamalgam leicht zur zugehörigen Bernsteinsäure reduzieren lassen. Anhydrierungsversuche vermittelst Azetylchlorid blieben erfolglos. Es handelt sich sonach wahrscheinlich um:

$$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3}{CH_3}{>}C = CH.CH_2.CH = \underset{\displaystyle COOH}{C} - CH_2.COOH$$

d. i. 7 Methyloktadien(3.6)disäure (1.3).

Greifswald Juni 1903, Pharmakol. Inst.

*) Vgl. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**, 574 (1901).

XXII.

Über die Beurteilung des Fäulniszustandes von Fleisch nach dem Gehalt an Bernsteinsäure.

Von Dr. **H. Wolff,**

(chem. Assistent a. d. I. med. Klinik in Berlin.)

Aus der I. med. Klinik der Univ. Berlin (Abteilung für Krebsforschung).
(Direktor: Geh.-Rat Prof. Dr. E. v. Leyden.)

Die Frage nach dem Vorhandensein bzw. der Entstehung von Bernsteinsäure in frischen oder der Zersetzung unterworfenen Organen schien durch die Arbeiten von Salkowski, Blumenthal und Magnus-Levy vollständig beantwortet zu sein. Nun erschien vor kurzem eine Arbeit von Kutscher und Steudel*), die eine Nachprüfung dieses Problems immerhin geboten erscheinen ließ.

In ihrer Mitteilung „Über Methoden zur Begutachtung des Fleischextraktes" besprechen die genannten Verfasser die von ihnen gefundene auffallende Tatsache der Anwesenheit großer Mengen von Bernsteinsäure in Liebigs Fleischextrakt.

Dieser Befund — aus je 50 g Fleischextrakt konnten 0,325 bis 1,103 g der Säure isoliert werden — erregt deshalb einiges Befremden, da er darauf hinzudeuten scheint, daß bei der Bereitung des Extraktes faulendes Fleisch zur Anwendung gelangt. Nach Salkowskis und Blumenthals Arbeiten findet sich Bernsteinsäure nämlich nicht in frischem Fleisch, sondern tritt erst bei der Fäulnis als Stoffwechselprodukt von Bakterien auf. Nach Magnus-Levy**) soll auch ohne bakterielle Wirkung bei der „Autolyse" von Organen Bernsteinsäure entstehen. Jedenfalls waren aber auch in diesem Fall — sobald sich Bernsteinsäure fand — die Organe völlig ungenießbar. Trotzdem scheuen sich

*) Über Methoden zur Begutachtung des Fleischextraktes, Zeitschr. f. physiol. Chemie 38, 101.

**) Diese Beiträge 2, 261.

Kutscher und Steudel, das oben erwähnte ungünstige Urteil zu fällen, da ihnen „der ausgezeichnete Ruf von Liebigs Compagnie" eine hinlängliche Garantie dafür bietet, daß zur Darstellung des Fleischextraktes nur tadelloses Ausgangsmaterial verwandt wird.

Nun ließe sich sehr wohl eine Erklärung für die Anwesenheit von Bernsteinsäure im Extrakt denken: Blumenthal hat in seiner Arbeit*) nur frisches und stark faulendes Fleisch untersucht; es erscheint aber keineswegs ausgeschlossen, daß in einem Zwischenstadium, in dem sich das Fleisch noch als genießbar bezeichnen ließe, bereits so viel Bernsteinsäure gebildet ist, wie den von Kutscher und Steudel gefundenen Mengen entspricht.

Durch die vorliegende Arbeit glaube ich indessen nachgewiesen zu haben, daß diese Erklärungsmöglichkeit fortfällt. Nimmt man nämlich an, daß zur Herstellung von 50 g Fleischextrakt 3 kg Fleisch erforderlich sind — ein Wert, der sicher nicht zu niedrig gewählt ist —, so müßten sich zur Deckung des kleinsten von Kutscher und Steudel gefundenen Gehaltes an Bernsteinsäure (0,325 g in je 50 g Fleischextrakt) in 1 kg Fleisch über 0,100 g Bernsteinsäure finden. Das Fleisch, in dem ich aber solche Quantitäten fand, war als ungenießbar zu bezeichnen. Gleichzeitig konnte ich bestätigen, daß frisches Rindfleisch Bernsteinsäure nicht oder nur in Spuren enthält**).

Zur quantitativen Bestimmung wählte ich die Fällung der Bernsteinsäure als Silbersalz. Ich überzeugte mich davon, daß diese vor dem vielfach geübten Bleiverfahren***) besonders bei kleinen Quantitäten den Vorzug verdient, wenn man bei der Fällung folgende kleine Modifikation anbringt. Statt das Säuregemisch schwach ammoniakalisch zu machen und dann Silbernitrat zuzusetzen, fügte ich Silbernitrat zu der noch sauren Lösung, gab tropfenweise Ammoniak zu, bis gerade ein Niederschlag entstand, filtrierte, setzte zum Filtrat einen Tropfen Ammoniak, filtrierte durch dasselbe Filter und fuhr so fort, bis das Filtrat auf Zusatz von Ammoniak klar blieb: Man kann so leicht einen Überschuß von Ammoniak vermeiden, der einen Teil des Silbersalzes wieder auflösen würde.

Aus 0,0500 g Bernsteinsäure erhielt ich auf diese Weise
0,138 g Silbersalz = 0,049 Bernsteinsäure, bei einer anderen Probe sogar
0,139 „ „ = 0,0495 „ also 98 bis 99 Proz. der angewandten Menge. Mit Salzsäure aus dem Silbersalz in Freiheit gesetzt, kristallisierten beim Einengen im ersten Falle 0,044, im zweiten 0,045 g.

*) Virchows Archiv **137**, 539 (1899).
) Vergl. Salkowski, Zeitschr. f. klin. Med. Suppl. z. Bd. **17, 77 (1890).
***) Virchows Archiv **137**, 544.

also 88 und 90 Proz., aus. Nach der von Blumenthal angewandten Bleimethode konnten bei zwei Proben 0,040 und 0,043, also 80 und 86 Proz., wiedergewonnen werden.

Zur Prüfung der Methoden bei der Isolierung aus Säuregemischen, wie sie bei der Fleischfäulnis vorliegen, wurden je 0,100 (a), 0,300 (b) und 0,500 (c) g Bernsteinsäure mit einigen Kristallen Phenylessigsäure und Hydrozimtsäure und etwas Milchsäure versetzt. Die Mischung wurde sodann mit verdünnter Sodalösung aufgenommen, mit Schwefelsäure gerade sauer gemacht und mit Äther extrahiert. Der ätherische Auszug enthielt — Blumenthals Angaben entsprechend — neben der Phenylessig- und Hydrozimtsäure nur Spuren Bernsteinsäure*). Letzterer wurde nach stärkerem Ansäuern mit dem Alkoholäther-Gemisch ausgeschüttelt und nach dem Verdampfen und Aufnehmen mit Wasser als Silbersalz gefällt.

Resultat:

	Menge des Silbersalzes	der daraus berechneten Bernsteinsäure-Menge	der freigemachten und auskristallisierten Säure
a)	0,217	0,077 = 77 Proz.	0,072 = 72 Proz.
b)	0,625	0,222 = 74 „	0,214 = 71 „
c)	1,105	0,392 = 78 „	0,367 = 73 „

Dieselben Mengen Bernsteinsäure in derselben Weise behandelt, nur zuletzt nach der Blei-Methode von Blumenthal**) isoliert, gaben folgende Resultate:

	Mit dem Bleiverfahren kristallisierten:	Differenz mit der aus dem Silbersalz berechneten	Differenz mit der aus dem Silbersalz direkt gewonnenen Menge:
a)	0,066 g = 66 Proz.	11 Proz.	6 Proz.
b)	0,201 „ = 67 „	7 „	4 „
c)	0,359 „ = 72 „	6 „	1 „

Nachdem ich so festgestellt hatte, daß wenigstens bei kleinen Quantitäten Bernsteinsäure die Silbermethode empfehlenswerter ist, begann ich die Ausführung der eigentlichen Untersuchungen in drei Versuchsreihen.

I. Versuchsreihe.

2 kg Rindfleisch, frisch vom Schlächter geholt***), wurden in vier Teile zu je 500 g geteilt, einer sofort behandelt, die übrigen mit Pergament-

*) Ich überzeugte mich jedesmal davon, daß tatsächlich nur Spuren in den Äther übergehen, bisweilen versagte sogar die Pyrrolprobe (Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**, 574).

**) loc. cit.

***) Nach dessen Angaben am vorhergehenden Tag geschlachtet, ebenso bei den beiden andern Versuchen.

papier umwickelt in den Eisschrank gelegt. An jedem Tag wurde ein Teil folgendermaßen verarbeitet:

Das mit der Maschine zerkleinerte Fleisch wurde mit $1\frac{1}{2}$ Liter Wasser übergossen und zwei Stunden auf 100° erwärmt, dann koliert und scharf ausgepreßt. Das Filtrat wurde — nach dem Vorgange von Kutscher und Steudel — kalt mit Ammonsulfat gesättigt, von den abgeschiedenen Eiweißstoffen abfiltriert, mit etwas Soda versetzt und auf etwa $\frac{3}{4}$ des Volumens verdampft. Nach dem Erkalten und Filtrieren wurde mit Schwefelsäure gerade angesäuert, dreimal mit Äther ausgeschüttelt (zur Entfernung etwa vorhandener Hydrozimt- und Phenylessigsäure), dann stark sauer gemacht und sechsmal mit Alkoholäther ausgeschüttelt. Von den gesammelten alkoholisch-ätherischen Auszügen wurde $\frac{1}{10}$ gesondert abgedampft, um direkt zum qualitativen Nachweis der Bernsteinsäure mittelst der „Husten-“ und „Pyrrolprobe“ zu dienen. Der Rest, der $\frac{9}{10}$ des Gesamtgehaltes enthielt, wurde zur quantitativen Bestimmung verwandt. Die Resultate waren folgende:

1. Tag: Fleisch ganz frisch; Dampf- und Pyrrolprobe negativ.

2. Tag: Fleisch frisch, deutlich positive Dampfprobe und Pyrrolreaktion.

3. Tag: Fleisch noch immer frisch; ziemlich intensive Reaktionen.

4. Tag: Fleisch „angegangen“, d. h. äußerlich etwas faulend, im Inneren frisch.

Das wässerige Extrakt zeigt nicht den geringsten fauligen Geruch: Dampf- und Pyrrolprobe intensiv.

Aus $\frac{9}{10}$ des Extraktes isolierbar 0,080 g Silbersalz = 0,0284 Bernsteinsäure; auskristallisiert 0,025 (Schp. 179°).

II. Versuchsreihe.

5 kg Fleisch wurden in fünf Portionen à 1 kg zerlegt und jeden zweiten Tag untersucht. Die Aufbewahrung geschah wie bei I in Pergamentpapier und im Eisschrank.

Die Verarbeitung war der bei I beschriebenen analog, nur wurde nach dem Auftreten quantitativ bestimmbarer Bernsteinsäuremengen das gesamte Alkoholäther-Extrakt zur Bestimmung benutzt.

1. Tag: Fleisch frisch; Dampf- und Pyrrolprobe negativ.

3. Tag: Fleisch frisch; Dampfprobe positiv, Pyrrolreaktion fraglich.

5. Tag: Fleisch „angegangen“; das Extrakt riecht gut.

Das Fleisch kann (ebenso am 4. Tag von I) noch als genießbar bezeichnet werden.

Dampf- und Pyrrolprobe intensiv; isoliert (aus $\frac{9}{10}$): 0,133 g Silbersalz = 0,047 Bernsteinsäure; kristallisiert 0,042 g (Schp. 179°).

7. Tag: Fleisch faulig, Extrakt desgleichen; ungenießbar!

Aus der Gesamtmenge isoliert: 0,211 g Silbersalz = 0,075 Säure; auskristallisiert 0,069 g (Schp. 178°).

9. Tag: Fleisch faul 0,618 g Silbersalz = 0,219 g Säure; auskristallisiert 0,201 g (Schp. 180°).

III. Versuchsreihe.

4 kg Fleisch wurden in Portionen à 1 kg am 1., 3., 5. und 9. Tag untersucht.

1. Tag: Fleisch frisch; Dampf- und Pyrrolprobe positiv!

3. Tag: Fleisch frisch; Dampf- und Pyrrolprobe positiv, nichts isolierbar.

5. Tag: Fleisch angegangen, Extrakt frisch: isolierbar (aus $^9/_{10}$) 0,118 g Silbersalz = 0,042 g Säure: auskristallisiert 0,039 g (Schp. 181°).

9. Tag: Fleisch mäßig faul, Extrakt ebenso, aber völlig ungenießbar; isoliert (aus dem Gesamtauszug) 0,488 g Silbersalz = 0,173 g Säure; auskristallisiert 0,168 g Säure (Schp. 179°).

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, war bei den Verhältnissen, unter denen ich arbeitete, vom

1. bis 3. Tag gar keine oder eine nur qualitativ nachweisbare Menge Bernsteinsäure in dem noch frischen Fleisch vorhanden;

vom 4. bis 5. Tag konnte man das Fleisch als nicht mehr frisch, aber noch genießbar ansehen. Die Menge der Säure betrug (auf 1 kg berechnet)

Berechnet aus dem Silbersalz:	0,063	0,052	0,047 g
Direkt gewogen:	0,056	0,047	0,043 g

Am 7. Tag war sowohl Fleisch, wie wässeriger Auszug faul. Es berechneten sich Bernsteinsäure 0,075, während 0,069 auskristallisierten.

Am 9. Tag endlich wurden durch Berechnung 0,219 und 0,173 g, durch Wägung 0,201 und 0,168 g gefunden.

Nach diesen Ergebnissen scheinen also die größten Mengen Bernsteinsäure in den letzten Stadien der Fäulnis gebildet zu werden: Zwischen den am 5. und 7. Tag (II. Versuchsreihe) gefundenen Bernsteinsäuremengen ist die Differenz nur 0,027 g, während der Unterschied am 7. und 9. Tag 0,132 g beträgt. Dafür spricht auch, daß Blumenthal in sehr stark faulendem Rindfleisch 1,3 bis 1,8 g Bernsteinsäure pro Kilo fand, also 1 bis 1,5 g mehr als ich am 9. Tage und etwa 6 bis 9mal so viel.

Die Frage aber nach dem Ursprung der erheblichen Quantitäten Bernsteinsäure, die Kutscher und Steudel in Liebigs Fleischextrakt fanden, bleibt unbeantwortet. Eine Aufklärung wäre hier indessen sehr erwünscht, da es natürlich von lebhaftem, auch praktischem Interesse ist, ob die Darstellungsweise des Präparates oder die Verwendung schlechten Ausgangsmaterials das Vorhandensein der Bernsteinsäure veranlaßt.

XXIII.

Über die Einwirkung der Trypsinverdauung auf die Präzipitinreaktion.

Von Dr. phil. et med. **Karl Oppenheimer**, Assistenten des Instituts.

(Aus dem tierphysiol. Inst. der Landwirtschaftl. Hochschule Berlin, Dir. Prof. Dr. N. Zuntz.)

Eine der prinzipiell wichtigsten Fragen auf dem Gebiete der Präzipitinreaktion ist die, ob die beiden Komponenten, durch deren Zusammenwirken der spezifische Niederschlag entsteht, nämlich das Präzipitin einerseits, und der spezifische Anteil der zu fällenden Eiweißlösung andererseits, Eiweißstoffe sind, bzw. den Eiweißstoffen zugehören, oder ob es sich um selbständige Stoffe handelt, die den Eiweißkörpern der Lösungen nur mechanisch beigemengt sind.

Zur Entscheidung dieser Frage hat man sich außer anderer Methoden auch der Einwirkung der Proteasen bedient, in der Annahme, daß eine Resistenz der spezifischen Agentien gegen die proteolytischen Fermente gegen ihre Eiweißnatur sprechen müßte.

Wie zuerst L. Michaelis*) zeigte, und wie Michaelis und Oppenheimer**) des näheren ausführten, ist sowohl das Präzipitin selbst, als auch die „bindende Gruppe" der zu fällenden Substanz gegen Pepsinsalzsäure außerordentlich empfindlich. Auf diese Tatsache, die seither von verschiedenen Seiten bestätigt wurde, sei also hier nur hingewiesen.

Sie genügte an sich nicht, um die Zusammengehörigkeit der präzipitinbildenden Agentien mit den Eiweißstoffen zu erweisen, da die Wirkung dieses Agens auch andere spezifische Stoffe schädigt, die man ebenfalls nicht zu den Eiweißstoffen rechnet,

*) L. Michaelis, Untersuchungen über Eiweißpräzipitine. Dtsch. Med. Woch. 1902.

**) Michaelis und Oppenheimer, Über Immunität gegen Eiweißkörper. Engelmanns Arch. f. Phys. 1902. Suppl.-H. 336.

wie Diphtherieantitoxin und Rizin. Diese sind aber gegen Trypsin ziemlich resistent [Belfanti*), Pick**), Jacoby***)], so daß mit Recht die Trypsinwirkung als die weitaus bedeutungsvollere zur Entscheidung dieser Frage angesehen wird.

Über diese Frage entstand nun zwischen Obermayer und Pick†) einerseits und Michaelis und mir (l. c.) andererseits eine Differenz. Während nämlich die ersteren für das Eierklar eine Resistenz des Präzipitins gegen Trypsin angegeben haben, fanden wir, daß die bindende Gruppe des Blutserums sowohl, als auch das Präzipitin gegen Blutserum bei energischer Trypsinverdauung mit dem Eiweiß vernichtet wird. Da es an sich durchaus möglich war, daß das Eiklar sich anders verhält als das Serum, so nahm ich Veranlassung, die entsprechenden Verhältnisse am Eiklar einer Nachprüfung zu unterziehen.

Dazu mußten drei Fragen beantwortet werden: 1. Kann man durch Injektion von tryptisch verdautem Eiereiweiß noch ein Präzipitin erzeugen? 2. Wirkt ein starkes Antieierserum noch auf tryptisch verdautes Eiklar? 3. Kann man die präzipitierende Wirkung dieses Serums durch die Trypsinverdauung aufheben?

I.

90 ccm geschlagenes Eiweiß wurden mit 100 ccm Wasser, 1 g Soda und 3 g Pankreatin-Rhenania mit etwas Chloroform verdaut. Nach fünf Tagen starker Bodensatz von Tyrosin, das durch seine Kristallform und die üblichen Identitätsreaktionen nachgewiesen wurde. Die Flüssigkeit filtriert klar; beim Aufkochen nach Ansäuern mit Essigsäure noch starke Trübung. Zusatz von 1 g Pankreatin. Beim weiteren Stehen scheiden sich immer wieder geringe Tyrosinmengen ab, von denen abfiltriert wird. Schließlich wird die Flüssigkeit inkoagulabel und gibt keine Biuretreaktion mehr. Eine zweite Portion Eierklar wurde bei fast identischer Behandlung in neun Wochen inkoagulabel, gab aber noch starke Tryptophanreaktion.

Mit diesen Präparaten (hintereinander) wurde nun ein großes Kaninchen von etwa 2500 g monatelang in Portionen von 2 ccm aufsteigend bis 15 ccm intraperitoneal behandelt.

Die oft wiederholten Probeblutentnahmen zeigten niemals auch nur eine Spur von Präzipitinreaktion, weder mit normalem filtriertem Eiklar, noch mit dem Verdauungsgemische selbst.

*) Belfanti und Carbone, Contrib. alla conoscenza dell' antitoss. Sift. Arch. per le scienze med. 22, No. 2.

**) E. P. Pick, Zur Kenntnis der Immunkörper. Diese Beiträge 1, 351 (1901).

***) Jacoby, Über Riziniminunität. Diese Beiträge 1, 51 (1901).

†) Obermayer und Pick, Biol. Chem. Studien über das Eiklar. Wiener klin. Rdsch. 1902, No. 15.

II.

Das Serum eines Kaninchens, das mit frischem Eiklar ein kräftiges Präzipitin gab, zeigte mit den beiden verdauten Präparaten in wiederholten Versuchen niemals die geringste Präzipitinreaktion.

Es wurde auch gegen eine durch Papaïn verdaute Eiklarlösung geprüft.

100 g Eiklar wurden mit 280 ccm, 0,8-proz. NaCl und 10 g Papaïn-Merck bei natürlicher Reaktion etwa drei Wochen verdaut. Die filtrierte Flüssigkeit zeigt noch schwache Trübung beim Aufkochen in schwach saurer Lösung, die wohl auf Eiweißstoffe des Papaïns zurückzuführen ist, und noch starke Biuretreaktion.

Trotzdem ist die Präzipitinreaktion nicht mehr hervorzurufen:

0,3 Serum, 0,1 Ei

Ei, 3fach verdünnt + +	Ei, 10fach verdünnt + +
Papaïn-Ei (3fach verd.) — (nach 2 h.)	Papaïn-Ei (3fach verd.) — (nach 24 h.)

III.

Dem Kaninchen, das das starke Eierpräzipitin zeigte, werden aus der Iugularis etwa 10 ccm Blut entnommen; das gewonnene Serum mit der gleichen Menge Wasser, 1 g Trypsin und einigen Tropfen Chloroform verdaut.

Nach drei Tagen noch eine Messerspitze Pankreatin. Nach 14 Tagen ist das Serum inkoagulabel, gibt noch Biuretreaktion.

Prüfung auf Präzipitin gegen filtriertes Eierklar ist absolut negativ; auch nach 24 h. nicht die geringste Trübung, die über die minimale Trübung der Kontrollflüssigkeiten (Serum und Ei jedes für sich) hinausgeht.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß alle drei Fragen in identischem Sinne beantwortet sind: Durch energische Trypsinverdauung ist sowohl die bindende Gruppe, als auch das Präzipitin glatt zu vernichten. Das Eierklar verhält sich in keiner Weise anders als das Blutserum. Die entgegenstehenden Resultate von Obermeyer und Pick sind wohl daraus herzuleiten, daß die beiden Forscher nicht so weit abgebaut haben, daß die Koagulation völlig verschwunden war, was, wie wir oben zeigten, auch beim Eierklar ziemlich lange dauert. Die Betrachtungen, die wir an die Tatsache der Verdaulichkeit durch Trypsin angeknüpft haben, bleiben also auch bezüglich des Eierklars zu Recht bestehen.

Kürzere Mitteilungen.

2. Bemerkung zu der Arbeit von K. Glaessner „Über die antitryptische Wirkung des Blutes“.

(Diese Beiträge **4**, Seite 83.)

Von **K. Landsteiner.**

In der angeführten Arbeit teilt Glaessner die Resultate von Versuchen über die Ausfällung antitryptischer Stoffe aus Blutserum mit und macht auf den Gegensatz zwischen seinem Ergebnis und einer Angabe von mir aufmerksam. Dazu möchte ich bemerken, daß ich bei einer Wiederholung dieser Versuche selbst zu einem abweichenden Resultat gekommen bin und darüber schon vor einiger Zeit berichtet habe*). Die Ursache des auch jetzt noch bestehenden Widerspruches in den Angaben werde ich mich aufzuklären bemühen.

*) Centrabl. f. Bakteriol. **31**, 784.

Beiträge

zur

Chemischen Physiologie

und

Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

IV. Band. 7. und 8. Heft

(Ausgegeben September 1903)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1903

Inhalt des 7. und 8. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XXIV.

Über das Schicksal der mit Umgehung des Darmkanals eingeführten Eiweißstoffe im Tierkörper.

Von Dr. phil. et med. **Carl Oppenheimer,** Assistenten des Instituts.

(Aus dem tierphysiol. Inst. der Landwirtschaftl. Hochschule Berlin, Dir. Prof. Dr. N. Zuntz.)

Die Frage nach der Aufnahme und Verwertung der dem tierischen Organismus zugeführten Eiweißsubstanzen ist durch grundlegende Untersuchungen der letzten Jahre in neue Bahnen gelenkt worden.

War auch schon von älteren Autoren der Satz vertreten worden, daß die Eiweißstoffe nur in gelöstem Zustande der Assimilation entgegengeführt werden, so geht doch die moderne Anschauung sehr viel radikaler vor, indem sie den Satz aufstellt, daß der Aufnahme der Eiweißstoffe im Darm eine Spaltung vorhergehen muß, die recht weitgehend ist.

Kutscher und Seemann*) zeigten, daß sich im Darminhalt die Endprodukte der tryptischen Verdauung, Aminosäuren und Hexonbasen, direkt nachweisen lassen. Cohnheim**) gelang es, das Verschwinden der Peptone aus dem Darm auf die Wirksamkeit eines eigenen Enzyms, des Erepsins, zurückzuführen, das die peptischen Abbauprodukte (Albumosen, Peptone) in einfachere kristalloide Stoffe, wie Aminosäuren und Hexonbasen überführt.

Aus diesen einfachen Körpern soll der Organismus dann in einer Synthese die ihm eigenen Eiweißkörper seines Protoplasmas aufbauen. Daß eine derartige Synthese anzunehmen gestattet ist, zeigten die zahlreichen Arbeiten früherer Autoren, nach welchen gewisse Bruchstücke des Eiweißmoleküls, namentlich die Aminosäuren,

---

*) Kutscher und Seemann, Zur Kenntnis der Verdauungsvorgänge im Dünndarm I und II. Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 530; **35**, 432 (1902).

) Cohnheim, Die Umwandlung des Eiweiß durch die Darmwand. Zeitschr. f. physiol. Chemie **33, 451 (1901). Weitere Mitteilungen über das Erepsin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **35**, 134 (1902). Trypsin u. Erepsin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 13 (1902).

im Organismus als Eiweißsparer ausgenutzt werden*), sowie vor allem die Versuche von Loewi**), denen zufolge tatsächlich jenes Gemisch von kristalloiden Spaltungsprodukten, das er in einer biuretfrei gewordenen Lösung der Produkte der Pankreasselbstverdauung vor sich hatte, hinreicht, um den Organismus des Versuchshundes auf Stickstoffgleichgewicht zu erhalten.

Freilich erhoben andererseits Embden und Knoop***), sowie Langstein†) den Befund, daß auch Albumosen in der Blutbahn vorkommen, eine Tatsache, die dahin gedeutet wird, daß jene Albumosen ungespalten die Darmwand passiert haben und als solche zur weiteren Verarbeitung zu Organeiweiß benutzt werden.

Für die vorliegende Problemstellung ist dies prinzipiell gleichgiltig, denn auch durch diesen Befund wird die moderne Anschauung nicht erschüttert, daß es normalerweise jedenfalls nicht genuine Eiweißstoffe sind, die in die Blutbahn gelangen, um hier direkt als solche oder unter nach unbekannten Gesetzen sich vollziehenden Modifikationen zu Organeiweiß umgebildet zu werden.

Von einer ganz anderen Seite her fanden diese Schlüsse eine Bestätigung.

Wir haben in der „biologischen Reaktion“ des Tierkörpers auf genuine Eiweißstoffe, die in der Blutbahn kreisen, in der Präzipitinbildung, ein neues Mittel gewonnen, das uns die Anwesenheit von solchen unveränderten Eiweißstoffen in der Blutbahn anzeigt. Wenn also Nahrungseiweiß unverändert den Darm passierte, so müßte es durch diese Reaktion im Blute nachweisbar sein; und daß dies normalerweise nicht der Fall ist, gibt auf anderem Wege jenen aus analytischen und synthetischen Befunden gezogenen Schlüssen neue Beweiskraft.

Freilich ist diese Unpassierbarkeit der Darmwand für unveränderte fremde Eiweißkörper keine absolute.

Unter gewissen Bedingungen treten auch sie unverändert durch die Darmwand hindurch und zeigen ihre Anwesenheit im Blute eben durch jene biologischen Reaktionen.

---

*) Die ältere Literatur s. b. Bahlmann, Über die Bedeutung der Amidsubstanzen für die tierische Ernährung. Dissertation. Erlangen 1885.

) Loewi, Über Eiweißsynthese im Tierkörper. Archiv f. experim. Pathologie **48, 303 (1902).

***) Embden und Knoop, Über das Verhalten der Albumosen in der Darmwand. Diese Beiträge **3**, 120 (1902).

†) Langstein, Über das Vorkommen von Albumosen im Blut. Diese Beiträge **3**, 373 (1903).

Diese Bedingungen können z. B. dadurch erfüllt sein, daß den natürlichen Kräften des Darmes, die sonst die Veränderung der zugeführten Eiweißstoffe besorgen, eine zu große Arbeit zugemutet wird, daß nämlich eine Überschwemmung des Magens mit fremden Eiweißstoffen stattfindet. Wie Uhlenhuth*) bei Fütterung mit großen Mengen Eiereiweiß, Michaelis und ich**) bei entsprechenden Versuchen mit Rinderserum am Kaninchen zeigen konnten, tritt bei einer Dosis von etwa 200 ccm Serum per os bei einem 2 kg schweren Tier während 16 Tagen eine deutliche Präzipitinreaktion in dem Serum des Kaninchens auf. Daraus kann man folgern, daß bei dieser Überschwemmung der Verdauungswege mit großen Mengen eines noch dazu dem Tiere ungewohnten Nahrungseiweißes die Eiweißstoffe sich zum Teil den Einwirkungen entzogen haben, die sie sonst angreifen, und durch die Wand des Verdauungskanals hindurch in die Blutbahn gelangt sind.

Daß dies aber auch unter weniger gewaltsam hergestellten Bedingungen der Fall zu sein scheint, dafür sprechen die Befunde von M. Ascoli***), der bei Hunden nach Fütterung mit rohen Eiern, ja sogar mit gebratenem Hühnerfleisch Präzipitine gesehen haben will. Freilich bedürfen diese Versuche einer Nachprüfung, da einerseits bisher alle Versuche, beim Hunde Präzipitine zu erzeugen, fehlgeschlagen sind, andererseits die Resistenz der präzipitablen Substanz gegen Hitze nach unseren Versuchen nicht sehr bedeutend ist.

Jedoch ist diese Frage von sekundärer Bedeutung. Es ist sehr wohl möglich, daß auch unter ganz normalen Bedingungen ein geringerer Anteil des eingeführten Eiweißanteils die Barriere durchbricht und in der Blutbahn erscheint. Sieht man von einem bisher sich der Kontrolle entziehenden dritten, wichtigen Faktor zunächst ab, nämlich der Rolle, die hierbei die Permeabilität des Darmepithels für genuine Eiweißstoffe selbst spielt, so hängt die Menge des unverändert die Darmwand passierenden genuinen Eiweißes von der relativen Stärke zweier Faktoren ab, der zugeführten Menge genuinen Eiweiß einerseits, und der Aktivität der verdauenden Faktoren andererseits. Wie Michaelis

*) Uhlenhuth, Neuer Beitrag zum spezifischen Nachweis von Eiereiweiß. Deutsche med. Wochenschrift 1901, 734.

**) Michaelis und Oppenheimer, Über Immunität gegen Eiweißkörper. Engelmanns Arch. 1902. Suppl. II. 336.

***) M. Ascoli, Neue Tatsachen und neue Ausblicke in der Lehre der Ernährung. Münch. med. Wochenschrift Nr. 5, 1902.

und ich (loc. cit.) gezeigt haben, ist es das Pepsin des Magens, das die Eiweißkörper sehr schnell angreift und ihnen die Fähigkeit nimmt, Präzipitine zu erzeugen. Wenn also ein genuiner Eiweißstoff im Blute erscheint, so ist er der Wirkung des Pepsins entgangen. Dies kann entweder daher rühren, daß es eine zu große Gabe Eiweiß war, die den Magen überflutete, besonders wenn es in flüssiger Form dargereicht wurde, so daß es zunächst unverändert in das Darmlumen gelangen konnte, oder aber daß die peptische Funktion zu gering war.

Das Trypsin scheint dabei eine viel geringere Rolle zu spielen, da es zum mindesten gerade bei den Eiweißstoffen, mit denen bei diesen Versuchen experimentiert wurde, nämlich Eiereiweiß und Serum, die bindende Gruppe sehr viel langsamer angreift als das Pepsin (Obermayer und Pick*), Michaelis und Oppenheimer).

Es hat demnach den Anschein, als ob die Eiweißkörper, wenn sie einmal den Magen passiert haben, auch der tryptischen Verdauung leichter entgehen, also unverändert die Darmwand passieren können; dies steht wiederum mit den Resultaten von Embden und Knoop und Langstein, daß die durch Pepsinwirkung entstandenen Albumosen hindurchpassieren können, in bestem Einklange.

Mit der Annahme, daß unter Umständen genuine Eiweißstoffe ins Blut gelangen, stimmen auch die zahlreichen Erfahrungen überein, daß bei einer gewissen Durchlässigkeit des Nierenfilters Eiweißstoffe der Nahrung in den Harn gelangen können. Dieses Problem der „alimentären Albuminurie" muß auch von dieser Seite her beleuchtet werden.

So fanden z. B. Ascoli (loc. cit.) und Inouye**), daß sich per os eingeführtes Eiereiweiß beim Kaninchen im Harn durch die biologische Reaktion wiederfinden läßt. Es ist gar keine Frage, daß das fremde Eiweiß, wenn es erst einmal in der Blutbahn kreist, die Nieren passieren kann, das Nierenfilter also für fremde Eiweißstoffe durchlässig ist, ohne daß eine wirkliche Erkrankung der Niere eintritt. Dies folgt noch viel präziser aus den Versuchen mit direkter Injektion, auf die wir unten zurückkommen werden.

---

*) Obermayer und Pick, Biolog. Studien über Eierklar. Wiener klin. Rundschau Nr. 15, 1902.

**) Inouye, Über alimentäre Albuminurie. Archiv f. klin. Medizin 75, 378 (1903).

Wenn aber die Eiweißstoffe als solche ausgeschieden werden, so müssen sie zuvor in der Blutbahn vorhanden gewesen sein, und es fragt sich, ob dieser Zustand der alimentären Albuminurie nicht viel wichtiger ist in bezug auf die Frage einer etwaigen Insuffizienz der Verdauungsorgane, die das Eiweiß passieren lassen, also eines alimentären Vorhandenseins fremder Eiweißstoffe im Blut, als in bezug auf die Undichtigkeit des Nierenfilters, die bei Einführung von Eiweißstoffen mit Umgehung des Darmkanals in jedem Falle besteht.

Es ist aber auch andererseits denkbar, daß der Übertritt von gewissen Mengen genuinen Nahrungs-Eiweißes in die Blutbahn eine regelmäßige, normale Erscheinung ist, worauf wir bereits oben hingedeutet haben, und daß es allerdings noch besonderer, abnormer Bedingungen bedarf, um diese Anteile im Harn wiedererscheinen zu sehen; mit anderen Worten, daß der normale Organismus über Mittel verfügt, um geringe Mengen solchen fremden Eiweißes, das in seiner Blutbahn kreist, zu zerstören, vielleicht zu assimilieren, ohne daß es im Harn erscheint.

Es entsteht dabei also, ganz allgemein gesprochen, die Frage nach einer etwaigen Verdauung und Ausnützung von fremdartigem Eiweiß, das in die Blutbahn eingetreten ist, sei es auf dem Wege der unveränderten Resorption vom Darmkanal aus, sei es durch Einführung unter Vermeidung des Darmkanals, subkutan, intravenös oder intraperitoneal, eine Einführung, die ich der Bequemlichkeit halber parenteral nennen möchte.

Nun unterliegt es keinem Zweifel, daß der Organismus tatsächlich im stande ist, Eiweiß, das ihm auf einem derartigen Wege zugeführt wird, teilweise für sich auszunutzen.

Die ersten Versuche in dieser Hinsicht machten Menzel und Perco*), die Milch und Eidotter subkutan, auch bei Menschen, injizierten. Krueg**) und R. Pick***) hatten ebenfalls praktische Erfolge mit Milch und Eidotter, ähnlich Whittacker mit Milch und Fleischsaft.

---

*) Menzel und Perco, Über die Resorption von Nahrungsmitteln vom Unterhautzellgewebe aus. Wiener med. Wochenschrift Nr. 31, 517, 1869.

**) Krueg, Künstliche Ernährung durch subkutane Injektionen. Wiener med. Wochenschrift No. 34 S. 753, 1875.

***) Pick, Über Ernährung mittelst subkutaner Injektion. Deutsche med. Wochenschrift 1879, S. 31.

Systematisch wurden diese Versuche aber erst von v. Leube*) durchgeführt, der subkutane Ernährung mit Alkalialbuminaten und Syntonin vorschlug. Dagegen gibt er an, daß die genuinen Eiweißstoffe, Kasein und Eiereiweiß nicht direkt assimilierbar sind, Peptone und Albumosen aber geradezu giftig wirken und im Harn wieder ausgeschieden werden.

Die ersten exakten physiologischen Beobachtungen über den Wert intravenös eingeführter Eiweißstoffe verdanken wir Zuntz und v. Mering**), die auf eine ziemlich restlose Verbrennung der von ihnen injizierten Eiweißstoffe schließen konnten. Sie benutzten Serum, Eiereiweiß und „Pepton", d. h. die Produkte kurzer Pepsinverdauung von Fibrin. Auch Neumeister***) konnte eine Verwertung von intravenös injizierten Eiweißstoffen nachweisen. Er benutzte zwar vorwiegend leicht denaturierte, wie Syntonin und Albuminate, erzielte aber ähnliche Erfolge auch mit genuinem Phytovitellin und Serumalbumin.

Lilienfeld†), dessen Arbeit sich an die Versuche von v. Mering und Zuntz anschließt, erzielte mit Konglutin gute Resultate, während er nach Syntonininjektion eine schwere Albuminurie beobachtete.

Es ist danach als erwiesen anzusehen, daß ein gewisser Teil des parenteral dem Organismus zugeführten Eiweißes zur Retention und damit wohl auch zur Verwertung gelangt.

Als Maß für die Größe dieser Verwertung kann man, mangels exakter Bilanzversuche, die anzustellen ich mir als weitere Aufgabe gestellt habe, vorläufig nur die Retention annehmen, d. h. die Differenz zwischen der eingeführten und der im Harn wieder ausgeschiedenen Menge des zugeführten Eiweißes; doch sind bisher zahlenmäßige quantitative Beziehungen zwischen diesen Größen noch niemals, soweit ich ersehen konnte, festgestellt worden, eine Lücke, zu deren Ausfüllung die unten beschriebenen Versuche beitragen sollen.

Wie schon die älteren Untersucher feststellten (Zuntz und v. Mering, Neumeister loc. cit.), ist die Eiweißausscheidung im Harn nicht stets vorhanden. Es liegt das vorwiegend an der

---

*) v. Leube, Über subkutane Ernährung. Kongr. f. inn. Medizin 1895, 418.

) Zuntz und v. Mering, Inwiefern beeinflußt Nahrungszufuhr die tierischen Oxydationsprozesse? Pflügers Archiv **32, 173 (1883).

***) Neumeister, Zur Frage nach dem Schicksal der Eiweißnahrung im Organismus. Sitzungsber. Phys. Med. Soz. Würzburg 1889.

†) Lilienfeld, Versuche über intravenöse Ernährung. Zeitschrift f. phys. diät. Therapie **2**, 3 (1899), S.-A.

Art des zugeführten Proteids. Namentlich vom Serumeiweiß ist verschiedentlich angegeben worden, daß es so gut wie gar nicht in den Harn übergeht.

Stokvis*) fand Eiweiß nach Injektion von Eiereiweiß, nicht aber von Blutserum bei Kaninchen und Hunden. Ponfick**) gab Hunden Lammblutserum intravenös und fand kein Eiweiß, ebensowenig Ott***) nach Infusion großer Mengen Pferdeserum beim Hunde. Friedenthal und Lewandowski†) fanden bei intravenöser Einführung ziemlich geringer Mengen Serum schwere Vergiftungserscheinungen und Todesfälle sehr plötzlicher Art. Dagegen konnten sie Kaninchen sogar 70 ccm Kalbsserum injizieren, ohne daß etwas im Harn auftrat, wenn sie es vorher auf 58° bis 60° erwärmten. Ob bei dieser Temperatur, die das giftige Prinzip des Serums zerstört, auch schon leichte Degenerationen des Eiweißmoleküls selbst eintreten, die das genuine Eiweiß leichter resorbierbar machen, muß dahingestellt bleiben.

Auch das Plasmaeiweiß der Maja, einer Krustacee, wird von Kaninchen nicht ausgeschieden. (v. Dungern.††)

Nach meinen eigenen Erfahrungen wird Pferde- und Rinderserum beim Kaninchen, Milcheiweiß beim Hunde nicht oder nur in sehr geringen Mengen ausgeschieden, während Eiereiweiß stets zum Teil wieder erscheint.

Ich habe deshalb meine Hauptversuche mit Hühnereiweiß angestellt und nur einige Parallelversuche mit Serumeiweiß gemacht, weil beim Hühnereiweiß aus dem Verhältnis von Einführung zu Ausscheidung ein Schluß auf die Ausnutzung gezogen werden kann.

Dabei fragt sich allerdings noch, ob man berechtigt ist, die im Harn wieder ausgeschiedene Eiweißmenge tatsächlich ganz auf das Verlustkonto zu setzen. Wie nämlich Ascoli†††) zuerst zeigte und Hamburger*†) bestätigte, ist ein Teil des im Harn

*) Stokvis, Hühnereiweiß und Serumeiweiß und ihr Verhalten zum tierischen Organismus. Cntbl. d. med. Wiss. 1864, 596.

**) Ponfick, Experimentelle Beiträge zur Lehre von der Transfusion. Virchows Archiv 62, 273 (1875).

***) Ott, Über den Einfluß der Transfusion. Virchows Archiv 93, 114 (1883).

†) Friedenthal und Lewandowski, Über das Verhalten des tierischen Organismus gegen fremdes Blutserum. Engelmanns Archiv 1899, 531.

††) v. Dungern, Die Antikörper. Jena 1903, S. 90.

†††) Ascoli, Über den Mechanismus der Albuminurie. Münch. med. Wochenschrift 1902, 398.

*†) Hamburger, Zur Frage der Immunisierung gegen Eiweiß. Wiener klin. Wochenschrift, Nr. 45, 1902.

ausgeschiedenen Eiweißes Körpereiweiß des Tieres selbst: Serumeiweiß, das sich durch die biologische Reaktion nachweisen läßt. Es scheint also die Injektion von körperfremdem Eiweiß eine Schwächung des Nierenfilters zu bedingen, die zu einer leichten, schnell vorübergehenden Albuminurie führt.

Einen irgendwie erheblichen Grad scheint aber diese Schwächung nicht zu erreichen, denn wie andere, so fand auch ich den Harn meiner Tiere nach 48 h. wieder völlig eiweißfrei.

Die Angabe von Linossier und Lemoine*), daß schon geringe Seruminjektionen (¼ ccm!) bei Kaninchen schwere, langdauernde Albuminurien mit tiefen Schädigungen des Nierengewebes hervorrufen sollen, widerspricht so völlig allen bisher zahlreich gemachten Beobachtungen, daß man ihr mit größter Skepsis entgegentreten muß. Ich habe selbst nach ausgiebigen Injektionen von Pferdeserum bei Kaninchen niemals langdauernde Albuminurie oder irgendwelche Störungen auftreten sehen, wie die Versuchsresultate zeigen werden.

Wenn die Tiere nicht, wie es bisweilen vorkommt, ganz akut unter der Wirkung zu großer Serumdosen zugrunde gehen, ohne daß der Sektionsbefund irgend etwas Entscheidendes ergibt, so zeigen sie außer geringen Temperatursteigerungen nichts Abnormes; und der Harn ist nach höchstens 72 h. wieder eiweißfrei. Auch die Angaben, die Arthus**) soeben publiziert hat, beziehen sich auf plötzliche Todesfälle oder aber auf Nekrosen nach subkutanen Injektionen, die allerdings häufig beobachtet werden.

Obwohl also immerhin der Einwand, daß man den Anteil an mitausgeschiedenem Körpereiweiß im Harne mitbestimmt, durchaus berechtigt ist, und einen, wenn auch sicherlich nur sehr kleinen, absoluten Fehler der Bestimmung bedingt, der mit unseren Methoden nicht zu beseitigen ist, darf man doch wohl der Bestimmung dieser Ausscheidungsgröße und ihrem Verhältnis zur Einfuhr einen relativen Wert beimessen. Wir besitzen eben zur Zeit keine andere Methode, als diese mit einem wohl ziemlich konstanten Fehler behaftete, um die ersten Schritte zur Lösung der interessanten Frage nach der „Verdauung in der Blutbahn" zu tun.

Ich glaube deshalb, auch meinen unten zu besprechenden quantitativen Versuchen einen relativen Wert beimessen zu dürfen.

---

*) Linossier und Lemoine, Note sur l'action néphrotoxique des injections de sérums normaux. Soc. Biol. 55, 515 (1903).

**) Arthus, Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. Soc. Biol. 26. VI. 03.

Mit der Frage nach der Ausnutzung parenteral zugeführter Eiweißsubstanzen verbindet sich noch eine zweite, nicht minder wichtige.

Die große Ähnlichkeit, die der Mechanismus der Präzipitinbildung mit den Vorgängen bei der Erlangung der Immunität, z. B. gegen Bakteriengifte, zeigt, hat mehrfach der Vermutung Worte geliehen, daß vielleicht auch der Zweck der Präzipitinbildung eine gewisse Verwandtschaft mit den Zwecken der Immunisierung besitzen möge, und Michaelis und ich (l. c.) haben diese Vermutung zuerst schärfer präzisiert.

Nachdem wir den Mechanismus der Antikörperbildung gegen Eiweißstoffe als entsprechend der Ehrlichschen Seitenkettentheorie hingestellt hatten, haben wir das Problem ventiliert, ob die ergophoren Gruppen der Präzipitine, die diese Theorie voraussetzt, eine wichtige Rolle bei der Assimilation parenteral zugeführten körperfremden Eiweißes besitzen könnten; ob die Präzipitine tatsächlich als Immunkörper fungieren, die den eingeführten Fremdkörper seiner Fremdartigkeit berauben, ihn unschädlich machen, und ob diese „Denaturierung", die der Aufnahme vorhergehen muß, und die sonst durch die Verdauungsenzyme bewirkt wird, vielleicht der Endzweck dieser Immunitätsreaktion ist.

Auf diese Möglichkeit weisen einige Ergebnisse hin, besonders die von uns beobachtete Mobilmachung der Leukocyten bei intraperitonealer Injektion, während andererseits die auch von Rostoski angegebene Tatsache, daß die sichtbare Reaktion, die Ausfällung der Eiweißsubstanzen in vitro, im Organismus nicht eintritt, dagegen zu sprechen scheint. Doch ist ein absolut bindender Beweis, daß eine solche Präzipitierung im Tierkörper nicht eintritt, wohl schwerlich zu erbringen.

Ein anderer Weg zur Entscheidung dieser Frage bietet sich dar, wenn man das Problem nach einer anderen Seite der Immunitätserscheinungen hin präzisiert. Wie bei zunehmender Immunität gegen Tetanustoxin das Versuchstier immer größere Dosen des Toxins neutralisiert, so könnte auch bei fortschreitender „Immunisierung" gegen fremdes Eiweiß die Aufnahmefähigkeit sich steigern. Als Maßstab für die fortschreitende Immunität hätte man die Präzipitinreaktion, als Maßstab für die Aufnahmefähigkeit die Ausscheidungsgröße im Harn mit dem oben erwähnten Vorbehalt anzusehen.

Derartige Versuche, Tieren stets dieselben Eiweißarten zu injizieren und den Quotienten der Einführung zu der Ausscheidung quantitativ zu bestimmen, habe ich nun seit einiger Zeit angestellt.

Inzwischen ist dieselbe Frage von Hamburger (loc. cit.) in Angriff genommen worden, der sich allerdings mit dem qualitativen Nachweis begnügte.

Er fand an Kaninchen, daß die nach der ersten Injektion von Eierklar auftretende Eiweißausscheidung sich bei den folgenden, in Zwischenräumen von 8 bis 10 Tagen wiederholten Injektionen allmählich verminderte (qualitativ) und nach der dritten bis sechsten Injektion verschwunden war. Injektionen geringer Mengen schützten auch gegen größere Dosen, die dann völlig zurückbehalten wurden.

Hamburger neigt also tatsächlich dazu, in diesem Sinne eine wirkliche Immunisierung gegen körperfremdes Eiweiß anzunehmen, deren Mechanismus allerdings dadurch noch dunkler wird, daß es ihm nicht gelang, in dem Gehalt des Blutes an dem injizierten Eiweißkörper, der durch die biologische Reaktion gemessen wurde, irgend welche Unterschiede aufzufinden; ein Versuch, der allerdings ziemlich hoffnungslos war, da an eine wirklich quantitative Verwertung der Präzipitinreaktion wohl noch nicht gedacht werden kann, solange wir völlig im unklaren sind, was denn eigentlich bei dieser Reaktion ausfällt.

Ich habe deshalb auf diese Frage wenig Wert gelegt und mich vorwiegend mit der Ausscheidung im Harn beschäftigt.

Ich kann die Resultate von Hamburger nicht vollinhaltlich bestätigen, da ich eine „Immunität" als konstante Erscheinung nicht beobachten konnte. Ich lasse zunächst meine Versuche folgen:

Ich experimentierte an Kaninchen, denen die benutzten Eiweißstoffe (Eierklar, Pferdeserum, Rinderserum) in einigen Versuchen intravenös, meist intraperitoneal injiziert wurden.

Die letztere Art der Einführung ist bei Kaninchen außerordentlich bequem, da sie ohne jede Vorbereitung ausgeführt werden kann. Selbst eine noch so oberflächliche Desinfektion der Kanüle hat sich schließlich als überflüssig erwiesen; ebenso habe ich Darmverletzungen mit letalen Folgen nie zu verzeichnen gehabt.

Der Harn wurde entweder aus der Blase ausgedrückt oder im Stoffwechselkäfig aufgefangen, mit etwas alkoholischer Thymollösung versetzt und filtriert. Dadurch erhielt ich ihn meist genügend klar, einige Harne mußte ich allerdings verwerfen, da sie selbst nach mehrfacher Filtration zu stark getrübt waren, als daß man auf eine exakte Bestimmung des Eiweißgehaltes hätte rechnen können.

Der Harn wurde dann auf ein bekanntes Volum aufgefüllt und zu zwei Bestimmungen verwendet. Die Eiweißfällung geschah in der Weise, daß ich den Harn (meist etwas verdünnt) mit etwa 2 Proz. Kochsalz (einigemal auch mit sehr wenig Zinksulfat, was sich nicht so bewährte), versetzte, mit sehr verdünnter Essigsäure ganz schwach ansäuerte, auf dem Wasserbade koagulierte und das Koagulum durch ein quantitatives Filter

abfiltrierte. Nach sehr gründlichem Auswaschen wurde das ganze Filter nach Kjeldahl unter Anwendung von Quecksilber verbrannt. Selbstverständlich überzeugte ich mich jedesmal von der Abwesenheit von Eiweiß im Filtrat (Zusatz von Ferrocyankalium). Das Eiweiß war stets völlig gefällt, und die Doppelbestimmungen genügend übereinstimmend.

In dem eingeführten Eierklar wurde der Stickstoffgehalt jedesmal bestimmt, vom Serum in einer größeren Portion, die mit etwas Chloroform konserviert wurde.

Natürlich haften dieser Methodik einige Fehlerquellen an. Im eingeführten Eiweiß entspricht der Gesamtstickstoff nicht dem wahren Eiweißgehalt; und im Harn fällt man den beim Kaninchen häufig vorhandenen, durch Essigsäure schon in der Kälte fällbaren Stoff mit als Eiweiß.

Indessen spielen diese Fehler hier, wo es sich ausschließlich um Vergleichswerte und ziemlich grobe Grenzen handelt, keine das Resultat nennenswert beeinträchtigende Rolle. Der Nicht-Eiweißstickstoff des Pferdeserums wurde übrigens bestimmt; er beträgt rund $^1/_{10}$ des Wertes.

Versuche.

Kaninchen I.

10. X. Kaninchen von 3420 g. Binnen 40′ werden aus einer Kanüle 10 ccm genuines, klar filtriertes Hühnereiweiß, mit der gleichen Menge 0,8proz. NaCl-Lsg. verdünnt, in eine Halsvene infundiert.

Harn vorher exprimiert. Minimale Trübung mit Essigsäure-Ferrocyankalium. HNO_3- und Biuretprobe negativ. Kein Zucker.

Direkt nach der Injektion:

Harn desgl.; etwas Blut (Hellersche Probe). Temp. abends 40,4°, morgens 39,2°. Wohlbefinden.

Nach 24 h. Harn trübe, filtriert.

Analyse:	Eiweißinjektion	= 77 mg N.
	Harneiweiß	= 31,2 mg N.
		= 40,5 Proz.

Nach weiteren 24 h. Harn eiweißfrei.

17. X. Demselben Tier 20 ccm unverdünntes Hühnereiweiß während 1 h. auf dieselbe Weise beigebracht.

Temp. nach 5 h. 40,3°; am andern Morgen 39,8°. Wohlbefinden. Einige Stunden nach der Injektion schleimiger Harn, am Morgen Harn exprimiert, nach Filtrieren klar. Beide vereinigt.

Analyse:	Eiweißinjektion	212 mg N.
	Harn	54 mg N.
		= 25,5 Proz.

Nach weiteren 24 h. Harn eiweißfrei.

28. X. Dasselbe Tier 30 ccm Eiweiß (N-Gehalt 269 mg) in eine Ohrvene binnen 20′. Temp. abends 39,5°. Etwas Freßunlust. Gewicht 3320 g. Am nächsten Tage munter.

Harn vor der Injektion eiweißfrei, 24 h. nach der Injektion:

Analyse: Eiweiß-N = 133,90 mg.

Der Harn des nächsten Tages enthielt eine eiweißähnliche Substanz, die nicht beim Kochen, aber mit Essigsäurezusatz koaguliert, HNO_3 positiv, Essigsäure + Ferrocyankalium negativ. Millon pos., Biuret angedeutet. Der Harn wird durch Kochen mit schwacher Essigsäure koaguliert. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird nicht klar. Nach 48 h.

durch gewogenes Filter filtriert. Menge des Niederschlages 0,2618 g. Wenn man diese auf ausgeschiedenes Eiweiß umrechnet, durch 6,5 dividiert = 40,3 mg

Total demnach	174,2 mg
	= 64,3 Proz.
Ohne den zweifelhaften Stoff	= 49,3 Proz.

Am nächsten Tage Harn völlig frei. Nun wurde ohne weitere Prüfung das Tier mit Eiweißinjektionen intraperitoneal weiter behandelt, indem es binnen fünf Wochen 150 ccm in Dosen von 30 bis 40 ccm bekam. Es trat jedesmal Temperatursteigerung und Eiweißausscheidung ein, sowie verminderte Freßlust, die bald vorüber gingen.

Am 2. I. Starke Präzipitinreaktion gegen Hühnereiweiß. Gegen durch Trypsin biuretfrei gewordenes Eiweiß = 0.

8. I. Dasselbe Tier, das also nach der Präzipitinreaktion „immun" geworden sein sollte, erhielt jetzt 5 ccm Eiweiß intravenös.

N =	140,5 mg
Harn nach 24 h. ausgeschieden	37,5 mg
	= 26,8 Proz.

Nach 24 h. Harn eiweißfrei.

22. I. Präzipitinreaktion:

Serum, isotonisch aufs Doppelte verdünnt:

0,6 + 0,1 Eiweiß 10fach verdünnt pos.
0,6 + 0,1 Eiweiß 50fach verdünnt pos.

Geg. verdautes Eiweiß (s. oben) negativ.

27. I. 10 ccm intraperitoneal = 168 mg.

Harn war leider so trübe, daß Eiweißbestimmung unmöglich. Nach nochmaligen zwei Injektionen zu je 10 ccm wird das Tier am Morgen tot gefunden, sehr wahrscheinlich infolge eines Unfalls. Befund negativ.

Kaninchen II. 1540 g.

Erhält intraperitoneal zunächst binnen 14 Tagen zweimal Hühnereiweiß, 18 und 27 ccm. Dann nach zehn Tagen 50 ccm auf einmal. Das Tier fiebert hoch, ist sehr matt, erholt sich wieder.

Eingeführt	915,7 mg
In 24 h. ausgeschieden	111,2 mg
	= 12 Proz.

Nach 14 Tagen: starke Präzipitinreaktion. Das Tier ist sehr elend, erhielt noch einmal 20 ccm. Nach 48 h. Harn eiweißfrei. Das Tier wird in der Agonie entblutet. Präzipitinreaktion schwach.

Kaninchen III

stirbt unmittelbar nach der zweiten Injektion von 15 ccm.

Kaninchen IV

erhält während vier Wochen 37 ccm Eiweiß in drei Rationen, nach einer Woche noch keine Präzipitinreaktion.

5. III. 10 ccm intraperitoneal	164,5 mg
Nach 24 h. ausgeschieden	70,15 mg
	= 47,7 Proz.

Bald darauf starke Präzipitinreaktion.

2. IV. 10 ccm Ei.

27. V. 30 ccm Ei = 433,5 mg N.

Im Harn etwa 7 mg wieder ausgeschieden (Fehlergrenze).

9. VI. 20 ccm Ei = 312 mg.
Ausgeschieden: nichts.
13. VI. Präzipitinreaktion.
Ei 0,1 Serum und isotonische NaCl-Lsg. āā 0,3; nach 1 h. gute, nach 24 h. starke Präzipitinreaktion.

Kaninchen V.

17. II. 10 ccm Eiweiß intraperitoneal
28. II. 10 ccm „ „ 185,5 mg N
ausgeschieden 41 mg N
= 22 Proz.
16. III. 15 ccm Ei.
20. III. Präzipitin noch fast negativ.
2. IV. 10 ccm.
8. V. 8 ccm.
14. V. Das Tier erhält 50 ccm Rinderserum intraperitoneal und geht daran binnen 2 h. zugrunde. Obduktionsbefund bis auf eine etwas weiche, hyperämische Niere negativ. In der Bauchhöhle weiche, durchsichtige Gerinnsel als Reste der injizierten Flüssigkeit.

Kaninchen X.

20. V. Intraperitoneal 20 ccm reines Eiweiß, N = 282 mg.
21/23. Harn enthält 133,5 mg N = 47,34 Proz.
3. VI. Desgl. 20 ccm = 289 mg N.
Ausgeschieden 51 mg = 17,6 Proz.
12. VI. Desgl. 20 ccm = 329 mg
Ausgeschieden: nichts (quantitativ).
Präzipitinreaktion 12. VI. (vor der Injektion entnommen)
Ei 0,1, Serum und 0,6 proz. NaCl-Lsg. je 0,3; nach 2 h. Hauch von Trübung; nach 24 h. angedeuteter Niederschlag.
20. VI. 30 ccm = 540 mg N. Harn nach 48 h. eiweißfrei.
Ausgeschieden 104,5 mg N = 19,1 Proz.

Man beobachtet also ein Nachlassen der Ausscheidung, einmal eine völlige Retention, wiederum aber ohne sichtlichen Zusammenhang mit Präzipitinbildung. Eine wirkliche Immunität ist auch jetzt nicht erzielt; denn die nächste Injektion bringt wieder eine erhebliche Ausscheidung hervor.

Kaninchen XI.

20. V. 20 ccm Ei = 282 mg N.
Der Harn gibt mit Essigsäure eine geringe Trübung.
Ausgeschieden 112,5 mg N = 39,5 Proz.
3. VI. 20 ccm Ei = 287 mg N.
Harn enthält kein koagulables Eiweiß.
12. VI. Präzipitinreaktion absolut negativ.
12. VI. 20 ccm = 329 mg N.
Ausgeschieden 65 mg N = 20 Proz.
20. VI. 30 ccm = 540 mg N.
Ausgeschieden 129 mg = 24 Proz.

Fast dasselbe Bild wie bei Kaninchen X. Ebenfalls enorme Schwankungen des Ausscheidungsquotienten ohne ersichtlichen Zusammenhang mit der Präzipitinbildung, die bei Kaninchen XI bisher sicher nicht eingetreten ist.

Kaninchen VIII (s. unten).

Das Tier ist schon monatelang mit Pferdeserum vorbehandelt.

20. V. 30 ccm Hühnereiweiß.

27. V. 30 ccm Ei (N = 433,5 mg).

Harn enthält nur 4 mg koagulablen Stickstoff (Fehlergrenze).

9. VI. 30 ccm Ei (N = 468 mg).

Harn enthält kein Eiweiß.

12. VI. Präzipitinreaktion absolut negativ.

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die mit Eiereiweiß behandelten Kaninchen meist einen beträchtlichen Teil des zugeführten Eiweißes wieder ausscheiden. Die Verhältniszahlen schwanken aber sehr erheblich. Weder die Art der Zuführung, noch das Auftreten der Präzipitinreaktion lassen irgendwelche Beziehungen zwischen der zugeführten und der ausgeschiedenen Eiweißmenge erkennen. Bisweilen scheiden relativ frische Tiere mit sehr schwacher oder gar keiner Präzipitinreaktion mehr in relativer Menge aus als solche, die länger vorbehandelt sind. Auch die absolute Menge des ausgeschiedenen Eiereiweißes schwankt erheblich, doch scheint um so weniger in relativer Menge ausgeschieden zu werden, je mehr Eiweiß zugeführt wird. Im allgemeinen sind aber alle Zahlen viel zu schwankend, um irgendwelche sicheren Schlüsse auf einen Zusammenhang zwischen Präzipitinreaktion und Eiweißretention ziehen zu lassen.

Außerdem scheint sich nach langer Vorbehandlung, aber gleichgültig mit welchem Eiweißkörper eine erhöhte Resistenz gegen Eiereiweiß einzustellen, die aber auch mit einer spezifischen „Immunisierung“ nichts zu tun hat. Kaninchen IV und VIII hielten schließlich beide eine sehr große Eiereiweißmenge restlos zurück, obwohl das eine, monatelang mit Eiereiweiß vorbehandelt, ein sehr kräftiges Präzipitin dagegen zeigte, während das andere, das vorher lange Pferdeserum und nur drei Eiereiweißinjektionen erhalten hatte, gar kein Präzipitin gegen Eiereiweiß zeigte. Für diese beiden Fälle kann ich also Hamburger recht geben: es scheint tatsächlich nach langer Vorbehandlung eine Art Resistenzerhöhung einzutreten, die aber unspezifisch, also keine Immunisierung ist und mit der Präzipitinbildung zweifellos nichts zu tun hat.

Versuche mit Serum.

(Pferdeserum, 10 ccm = 133 mg N.)

Kaninchen VIII.

Das Tier ist schon monatelang mit Pferdeserum vorbehandelt.

21. III.	10 ccm intraperitoneal.	
22/23.	Harn minimale Spuren Eiweiß.	
14. IV.	Präzipitinreaktion positiv.	
	10 ccm intraperitoneal	133 mg N
15/16.	Harn	7,5 mg N
		= 5,7 Proz.

Kaninchen IX. Desgl. vorbehandelt.

21. III.	10 ccm	133 mg
22/23.	Harn	15 mg
		= 11,3 Proz.
14. IV.	Präzipitinreaktion negativ.	
10 ccm.		
Harn		3,5 mg
		= 3 Proz.

Kaninchen X.
Ganz frisches Tier.

27. III.	10 ccm desselben Serums	133 mg N
28. III.	Harn	11,7 mg N
		= 8,8 Proz.
2. IV.	10 ccm.	
15. IV.	10 ccm.	

Harn-Spuren von Eiweiß, quantitativ nicht nachzuweisen.

2. V. 50 ccm auf einmal intraperitoneal. Tier fiebert abends bis 40,2°; erholt sich schnell. Harn enthält noch am vierten Tag Spuren Eiweiß.

Harn 3/6. N. =	48 mg
	= 7,3 Proz.

10. 5. Präzipitinreaktion positiv.

Schließlich wurde dem Kaninchen IV, das gegen Eiereiweiß „immun" war, 30 ccm Rinderserum intraperitoneal gegeben. Der Harn enthielt nach 24 h. nur Spuren Eiweiß, die nicht quantitativ zu bestimmen waren.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Serum der fremden Tierart beim Kaninchen, obwohl es erst später Präzipitinreaktion hervorruft, doch von Anfang an fast restlos zurückbehalten wird. Ich möchte auf die minimalen Eiweißzahlen nicht sehr viel Gewicht legen, da bei diesen ungemein geringen Werten (wenige Milligramme) der natürlich vorkommende, eiweißähnliche Körper des Kaninchenharnes sehr wohl eine erhebliche Rolle spielen kann, und in anderen Fällen ja tatsächlich ein quantitativ bestimmbarer Eiweißkörper auch bei durchgeführter Analyse nicht gefunden wurde. Man kann also wohl ohne erheblichen Fehler annehmen, daß das Pferde- und Rinderserum restlos im Organismus auch des frischen Kaninchens retiniert, also wohl verbraucht wird; und daß auch hier, und das ist der Berührungspunkt mit den Eiweißversuchen, ein Einfluß der „Immunisierung", die sich in der Präzipitinreaktion ausdrückt, in keiner Weise erkannt werden kann.

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchern wird also das Serum fast restlos aufgenommen; aber auch in dem ungünstigeren Falle, beim Eiereiweiß, verfügt der Organismus über Mittel, um in seiner Blutbahn kreisendes fremdes Eiweiß zum größten Teil festzuhalten, also auch wohl zu verwerten. Es zeigt dies, daß

also auch ein *normalerweise* eintretendes Übertreten von genuinem Nahrungseiweiß in die Blutbahn nicht ausgeschlossen ist und daß damit noch kein größerer Stickstoffverlust bedingt ist, da vielleicht diesen allmählich übertretenden geringen Mengen gegenüber die Niere ganz dicht schließt.

Andere, auch pflanzliche genuine Eiweißkörper, soweit sie löslich sind, darauf zu prüfen, sei einer späteren Versuchsreihe vorbehalten.

Jedenfalls zeigen ferner die Serumversuche, daß auch die Ausscheidung *eigenen Körpereiweißes* nach Injektion fremden Eiweißes sich hier wenigstens in minimalen Grenzen halten muß, wenn sie überhaupt auftritt, so daß man die Präzipitinreaktion auch nicht als eine *Schutzmaßregel* etwa gegen diesen Reiz auffassen könnte. Damit ist deren *Funktion* wieder in völliges Dunkel gehüllt. Von einer schweren Nierenreizung, wie sie *Linossier* und *Lemoine* (loc. cit.) gesehen haben wollen, kann hier nun schon gar keine Rede sein.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle meinem hochverehrten Chef, Herrn Prof. Dr. N. Zuntz, für sein stets reges Interesse an dieser Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

XXV.

Über das Verhalten des genuinen Serums gegen die tryptische Verdauung.

Von Dr. phil. et med. **Carl Oppenheimer** und Dr. phil. **Hans Aron**,
Assistenten des Instituts.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin, Dir. Prof. Dr. N. Zuntz.)

Der eine von uns hat vor kurzem in Gemeinschaft mit L. Michaelis*) die Aufmerksamkeit auf die schon früher gelegentlich mitgeteilte Tatsache gerichtet, daß das genuine Serum zwar von Pepsin-Salzsäure leicht angegriffen wird, und somit seine Eiweißkörper peptonisiert werden, daß es dagegen eine erstaunlich hohe Resistenz gegen die Verdauung durch Pankreasinfuse und künstlich daraus hergestellte Trypsinpräparate besitzt.

Diese Resistenz gegen Trypsin im Gegensatz zur Pepsinverdauung ist besonders charakteristisch für lebendes Protoplasma. Zuerst hatte Fermi**) darauf hingewiesen, daß lebende Mikroorganismen gegen Trypsin resistent sind. Später fand Matthes***) dasselbe für rote Blutkörperchen.

Michaelis und Oppenheimer nahmen Veranlassung, auf Grund der von ihnen beobachteten Schwerangreifbarkeit des genuinen Serums die Vermutung auszusprechen, daß diese unveränderten Eiweißstoffe der tierischen Gewebe möglicherweise noch in ihrer Konstitution eine gewisse Verwandtschaft mit der Struktur des Protoplasmas aufweisen möchten, und daß sie demzufolge in dieser Hinsicht eine gewisse Mittelstellung zwischen den leicht vom Trypsin spaltbaren Eiweißstoffen und dem völlig unangreifbaren lebenden Protoplasma einnehmen möchten.

---

*) Michaelis und Oppenheimer, Über Immunität gegen Eiweißkörper. Engelmanns Archiv 1902. Suppl.-H. 2.

**) Fermi, L'action des zymases protéolytiques sur la cellule vivante. Archiv. Ital. d. Biol. 1895, 433.

***) Matthes, Experimentelle Beiträge zur Frage der Hämolyse. Münch. med. Wochenschrift 1902, S. 8.

Inzwischen war aber die Frage nach der Ursache der Nichtangreifbarkeit lebender Gewebe durch Trypsin in ein anderes Licht gerückt durch die hochwichtige Feststellung von Weinland*), daß es sich unter Umständen gar nicht um eine wirkliche Resistenz, sondern um ein Ablenken des Enzyms durch ein präformiertes Antiferment handelt.

Weinland stellte fest, daß die Resistenz der parasitischen Eingeweidewürmer gegen die Enzyme des Darmes durch ein derartiges Antiferment bedingt ist, dessen Isolierung ihm aus Askarisextrakten gelang.

Derartige Antitrypsine finden sich aber auch im Blutserum, wo sie u. a. von Camus und Gley**), Charrin und Levaditi***), Landsteiner†), Glaessner††) gefunden worden sind. Sie kommen in jedem normalen Serum vor, lassen sich aber auch durch künstliche Immunisierung von Meerschweinchen mit Trypsin gewinnen, wie Achalme†††) gezeigt hat.

Diese Antikörper schützen vor allem andere Eiweißkörper vor der verdauenden Kraft des Trypsins, wenn man den Verdauungsgemischen Blutserum zusetzt, und zwar sind deutliche quantitative Beziehungen zwischen der Menge zugesetzten frischen Serums und der Menge aktiven Trypsins zu demonstrieren. Durch Erhitzen auf 70°, wobei das Serum noch nicht koaguliert, kann man ihm die antifermentative Eigenschaft nehmen. Es drängt sich damit die Frage auf, ob diese Antifermente nicht auch bei der Resistenz gegen Trypsin, die das Serum selbst aufweist, eine entscheidende Rolle spielen, ob also nicht die oben angedeuteten Vermutungen über eine aus der Konstitution des Serumeiweißes folgende Resistenz der Begründung entbehrten.

Wir haben zur Entscheidung dieser und einiger anderer damit zusammenhängender Fragen die Resistenz des Serums und seiner Eiweißstoffe quantitativ untersucht und geben in folgendem

*) Weinland, Über Antifermente I und II. Zeitschrift für Biologie **44** (1902).

) Camus und Gley, Action du sérum sanguin sur quelques ferments digestifs. Soc. Biol. **49, 825 (1897).

***) Charrin und Levaditi, Défense de l'organisme contre les propriétés des sécrétions glandulaires. Soc. Biol. **52**, 83 (1900).

†) Landsteiner, Zur Kenntnis der antifermentativen Wirkung des Blutserums. C. f. Bakter. **27**, 357 (1900).

††) Glaessner, Über die antitryptische Wirkung des Blutes. Diese Beiträge **4**, 79 (1903).

†††) Achalme, Propr. pathogène de la trypsine. Ann. Pasteur **15**, 737 (1901).

die bisher erzielten Ergebnisse. Leider konnte die Arbeit nicht ohne Störung schon jetzt so weit ausgedehnt werden, wie wir es für wünschenswert halten, da unsere gemeinsame Arbeit aus äußeren Gründen eine Unterbrechung erlitt. Wir hoffen indessen, später diese erste Mitteilung ergänzen zu können.

Über die eingeschlagene Methode ist folgendes zu bemerken:

Eine wirklich einwandsfreie Methode, um die Intensität einer Trypsinverdauung vergleichend zu messen, existiert bisher nicht. Bei der ungemeinen Kompliziertheit des Vorganges, bei dem zweifellos die verschiedensten chemischen Prozesse nebeneinander herlaufen, kann es nicht gelingen, ein Merkmal auszuwählen, das eine tatsächliche vergleichende Messung des Ablaufes der Verdauung gestattete.

Das wäre nur möglich, wenn es uns gelänge, eine Phase des Prozesses isoliert zu untersuchen, die von einem chemisch bekannten Stoffe zu einem oder mehreren andern bekannten Stoffen führte, wie das z. B. bei der Spaltung des Rohrzuckers oder des Amygdalins möglich ist. An diesen einfachen Vorgängen konnte Henri*) seine Messungen vornehmen, die ihn zu seinen theoretischen Vorstellungen über das Wesen der Fermentreaktion geführt haben. Aber schon bei der Stärkespaltung mußte er willkürlich ein Moment, nämlich die gebildete Maltose, herausgreifen, da der ganze Prozeß sich als völlig undurchsichtig erwies.

Noch viel mehr ist dies beim Abbau der Eiweißstoffe der Fall. Die verschiedenen Untersucher haben demzufolge die verschiedensten äußerlich erkennbaren Momente herausgegriffen, um den Abbau vergleichend zu verfolgen. Es sei nur erwähnt, daß man z. B. die spektrophotometrische Messung der Zunahme der Biuretreaktion [Klug**)], die Messung der optischen Drehung [Schütz***)], die Abnahme des spezifischen Gewichts [Schiff†)] und der Viskosität [Spriggs††)] als Maßstab benutzt hat.

Alle diese Methoden messen aber die Resultante der verschiedenartigsten Einwirkungen, deren Zusammenspiel man absolut nicht entwirren kann. Dasselbe gilt aber auch von der modernsten

---

*) Henri, Lois générales de l'action de quelques diastases. Paris 1903.

) Klug, Untersuchungen über Pepsinverdauung. Pflügers Archiv **60, 43 (1885), **65**, 330.

***) Schütz, Methode zum Bestimmen der relativen Pepsinmengen. Zeitschrift f. physiol. Chemie **9**, 577 (1887).

†) Schiff, Leç. d. phys. d. l. digestion. Berlin 1876.

††) Spriggs, On a new method of observing peptic activity. Journ. of physiol. 28. V. (1902).

Methode, die nach dem Vorgange von Oker-Blom*) und Henri und Larguier des Bancels**) die Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit als Maßstab nimmt. Obwohl diese Methode in derselben Lösung zu jeder gewünschten Zeit Messungen vorzunehmen gestattet und dadurch vielleicht für derartige Untersuchungen geeignet erscheint, konnten wir uns ihrer nicht bedienen. Denn wenn wir die Zunahme der Leitfähigkeit in einer Verdauungslösung messen, in der die verschiedensten, einander beeinflussenden, uns vollständig unbekannten Reaktionen vor sich gehen, mit andern Worten, wenn wir in diesem Falle eine kolligative***) Eigenschaft messen, so bekommen wir kein klares Bild von der Wirkungsweise und der Art des Angriffs des Fermentes. Deshalb müssen wir eine genau mit chemisch-analytischen Methoden meßbare Phase der Verdauung und eine uns bekannte Reaktion als Maßstab herausgreifen.

Schon andere Forscher benutzten rein chemisch-analytische Methoden.

Huppert und Schütz†) z. B. haben bei ihren ausgedehnten Untersuchungen über das Zeitgesetz des Pepsins die gebildete Menge der sekundären Albumosen als Maßstab gewählt.

Noch einfacher ist das Verfahren, das an festen Eiweißstoffen vielfach geübt wird, nämlich den Umfang der Auflösung zu messen, entweder durch Zurückwägen des Ungelösten, oder durch Messung an künstlich präparierten Eiweißzylindern, wie es die viel verwendete Mettsche††) Methode tut.

Ein ähnliches Verfahren schien auch für unsere Zwecke das Geeignetste. Uns kam es nicht darauf an, den weiteren Verlauf der Spaltung zu verfolgen, sondern ausschließlich darauf, die erste Phase, die Vernichtung der Genuinität des Serumeiweißes vergleichend zu beobachten. Eine der Eigenschaften, die in erster Linie dabei verschwinden, ist die Koagulationsfähigkeit, und diese haben wir gemessen.

Wir nahmen als Maßstab die Stickstoffmenge, die bei der Koagulation in sehr schwach saurer Lösung im Niederschlag enthalten war, verglichen mit demselben Wert, der an dem genuinen

*) Oker-Blom, Die elektrische Leitfähigkeit als Indikatoren der Eiweißspaltung. Skand. Archiv f. Physiol. 13, 359 (1902).

**) Henri und Larguier des Bancels, Loi de l'action de la trypsine sur la gélatine. Soc. Biol. 55, 563 (15. V. 03).

***) Ostwald, Lehrbuch der allgemeinen Chemie. S. 73.

†) Huppert und Schütz, Über einige quantitative Verhältnisse bei der Pepsinverdauung. Pflügers Archiv 80, 470 (1900).

††) Mett, Du Bois' Archiv 1894, S. 68.

Eiweiß erhalten wurde, und benutzten die Bestimmung des Stickstoffgehaltes im Filtrat als Kontrolle.

Daß auch dieses Verfahren nicht allen Anforderungen genügt, liegt auf der Hand; immerhin schien es uns für diesen Zweck am geeignetsten, zumal die Genauigkeit der Kjeldahlschen Stickstoffbestimmung die Auffindung sehr geringer Unterschiede gestattet.

Im Detail wurden die Bestimmungen in folgender Weise durchgeführt:

Zu den Versuchen wurde durchweg Pferdeserum benutzt, das aus frischem, defibriniertem Pferdeblut dargestellt war und mit einigen Tropfen Chloroform in fest verschlossener Flasche aufgehoben wurde. Das zur Verwendung gelangende Serum war nie älter als vier Wochen, auch stets nur schwach hämoglobinhaltig. Bei den ersten Versuchen wurden die Serummengen mit der Pipette direkt abgemessen, später wurde zur Erzielung genauerer Resultate das Serum vorher mit der vier- bis fünffachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Es wurde von jeder neuen Serumportion Gesamtstickstoff, koagulabler und Filtratstickstoff bestimmt, letzterer entsprechend bei der Berechnung in Abzug gebracht, da es sich nur um die Abnahme des genuinen, also koagulablen Eiweißes handelte. — Die Fermentmengen wurden so abgemessen, daß kurz vor dem Ansetzen einer Versuchsreihe etwa 10 bis 15 g Trypsin*) in ungefähr 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung zu einer feinen Emulsion gelöst und mit wenig Toluol versetzt, alsdann mit der Pipette, nachdem die Lösung jedesmal gut durchgeschüttelt war, die gewünschten Mengen entnommen wurden. Als Einheit (Trypsinmenge I) galten meist 10 ccm, manchmal 5 ccm dieser Lösung. Es wurde hier ebenfalls der Gesamtstickstoffgehalt dieser Trypsinlösung, ferner der Anteil an koagulablem und nicht koagulablem Stickstoff ermittelt und bei der Berechnung der Analysen in Abzug gebracht. Großes Gewicht wurde darauf gelegt, die Konzentration an Eiweiß und an Elektrolyten in den einzelnen Proben jeder Versuchsreihe genau gleich zu machen. Es wurden stets erst 100 ccm einer 10proz. Na_2CO_3-Lösung zugegeben und schließlich die Lösung mit aq. isot. auf 100 ccm, bei einigen Versuchsreihen auf 150 ccm, aufgefüllt. Doch fand, um die Lösungen zu gleicher Zeit ansetzen zu können, der Zusatz des Ferments zu allerletzt statt, nachdem vorher in entsprechender Weise bei jeder Probe Sodalösung und physiologische Kochsalzlösung dem Serum zugesetzt war. Die gut durchgeschüttelten Proben wurden mit wenig Chloroform und Toluol — möglichst gleichen Mengen bei allen Proben — konserviert. Als Anfangszeit galt $^1/_4$ Stunde nach dem Einsetzen in den Brutschrank, um die Lösungen vorzuwärmen. Das Unterbrechen der Verdauung fand durch tropfenweises Ansäuern mit einer ganz schwachen (2proz.) Essigsäure und sofortiges Erhitzen im Wasserbade bis zur flockigen Koagulation statt. Der möglichst gut ausgewaschene Niederschlag und das Filtrat nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure und Eindampfen wurden nach Kjeldahl verbrannt. Die Angaben der verdauten Mengen sind entweder in Prozenten des genuin vorhanden gewesenen, also anfangs koagulablen Serums oder in mg Stickstoff ge-

*) „Pankreatin" der Rhenania, ein recht wirksames Präparat.

macht. In beiden Fällen sind die vorher angedeuteten Korrektionen für Trypsinstickstoff und unkoagulablen Stickstoff angebracht.

Einige Versuchsreihen (III—VII) wurden so angestellt, daß man bei ihnen eventuell die Gültigkeit des Schütz-Borissowschen Gesetzes (cfr. Huppert und Schütz loc. cit.), das nach Vernon*) ja auch für die Trypsinverdauung des Fibrins gelten soll, auch bei der Verdauung der Serumeiweißkörper zu erkennen im stande war.

Das Gesetz besagt bekanntlich, daß die Mengen der Verdauungsprodukte — in diesem Fall der sekundären Albumosen — den Quadratwurzeln aus den Fermentmengen einerseits, den Quadratwurzeln aus den Zeiten andererseits proportional sind. So haben wir Versuche mit steigenden Zeiten bei gleichen Fermentmengen und mit steigenden Fermentmengen bei gleichen Zeiten angesetzt. Vor allem aber haben wir die Reihen so gewählt, daß die Menge der entstehenden Verdauungsprodukte immer die gleiche werden mußte**), indem wir Zeit und Fermentmenge so variierten, daß ihr Produkt konstant blieb, also z. B.

Zeit	Ferment	
1	4	
2	2	
4	1	usw.

Die angestellten Versuche waren folgende: Zunächst bedurfte die Grundtatsache, daß genuines Serum schwerer angreifbar ist als normalerweise die Eiweißstoffe, der quantitativen Feststellung. Wir wählen als Vergleichsobjekt Kasein, in Form des Plasmons, seiner Natriumverbindung.

Versuch I.

Serum: 40 ccm mit 338 mg N; Plasmon: 3,5 g mit 396,55 mg N; Trypsin: 2,5 g mit 370,5 mg N. 110 ccm Gesamtvolum. Na_2CO_3 1 Proz., NaCl 0,85 Proz.

Serum		Plasmon		
Verdaut	Unverdaut	Verdaut	Unverdaut	Zeit
72,78 Proz.	27,76 Proz.	96,91 Proz.	2,11 Proz.	1 Tag
80,26 „	20,63 „	100 „	—	2 Tage
97,40 „	7,13 „	100 „	—	7 Tage
98,04 „	4,55 „	100 „	—	15 Tage

*) Vernon, Journ. of phys. **26**, 405 (1901).

) cf. Bredig, „Elemente der chemischen Kinetik“; Ergebnisse der Physiol. **1, 1, S. 159.

Obwohl zu diesem Versuch so ungeheure Mengen Ferment angewandt wurden, daß der Stickstoffgehalt des angewandten Trypsins dem des Eiweißes fast gleichkam, ist doch noch eine beinahe eine Woche andauernde Resistenz des Serums zu konstatieren. Zu zeigen, daß Plasmon schon von viel geringeren Trypsinmengen ebenfalls ganz glatt seiner Fällbarkeit durch Säuren beraubt wird, schien überflüssig, da dies wohl als hinreichend oft bewiesen angesehen werden darf.

Der zweite Versuch mußte prüfen, ob tatsächlich die Genuinität des Serums es ist, die die so gefundene Resistenz bedingt. Zu dem Zwecke wurde ein vergleichender Versuch mit koaguliertem Serum angestellt. Es erübrigt, darauf hinzuweisen, daß dieser Versuch nichts für oder gegen die Bedeutung des Antitrypsins beweist, da dieses bei der Koagulation zerstört wird.

Von vier gleichen Serumportionen wurden zwei durch Ansäuern mit Essigsäure im Wasserbad koaguliert, das gut ausgewaschene Koagulum zur Verdauung benutzt. Die Trypsinmengen waren schon erheblich geringer als beim ersten Versuch, aber noch immer reichlich, wie ja die rasche Verdauung des koagulierten Eiweißes zeigt.

Versuch II.

Serum: 40 ccm mit 597,9 mg N; Trypsin: etwa 0,1 g mit 14,05 mg N Gesamtvolumen 400 ccm; Na_2CO_3 1 Proz.

Zeit	Genuin		Koaguliert	
	Verdaut	Unverdaut	Verdaut	Unverdaut
1 Tag	47,7 Proz.	43,4 Proz.	93,7 Proz.	6,2 Proz.
5 Tage	77,6 Proz.	21,1 Proz.	97,1 Proz.	2,7 Proz.

Es zeigt sich hier deutlich, wie das genuine Serumeiweiß dem Angriff des Trypsins einen viel größeren Widerstand entgegensetzt als das Eiweiß derselben Körperflüssigkeit im denaturierten Zustande.

Zu Ungunsten der koagulierten Proben kommt noch hinzu, daß bekanntermaßen rein mechanisch Eiweiß in koagulierter Form viel schwerer durch Fermente angreifbar ist als in kolloidaler Lösung. Es trägt dazu wohl hauptsächlich die Verkleinerung der Oberflächenwirkung bei, die bei der fermentativen Katalyse eine große, nach Hoeber*) vielleicht ausschlaggebende Rolle spielt.

*) Hoeber. Physik. Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig 1902.

Zuerst sollte nun festgestellt werden, welche Bedeutung für die Resistenz des genuinen Serums das von mehreren Forschern darin gefundene Antitrypsin besitzt. Es wurde ein vergleichender Versuch angestellt, bei dem unter den genau gleichen Bedingungen die Einwirkung des Trypsins auf genuines, also Antitrypsin enthaltendes Serum und auf „inaktiviertes“ Serum gemessen wurde, d. h. Serum, in dem das Antitrypsin durch zweistündiges Erhitzen auf 68° bis 70° zerstört war. (Achalme, loc. cit.)

Versuch III.

Serum: 5 ccm mit 73,2 mg N.
Trypsin: 5 ccm mit 1,35 mg N.
1 Proz. Sodalösung. Gesamtvolumen 100 ccm.

Zeit	Genuines Serum		Inaktiviertes Serum	
	Verdaut	Unverdaut	Verdaut	Unverdaut
20 Std.	11,71 Proz.	88,38 Proz.	25,56 Proz.	74,18 Proz.
48 „	25,68 „	75,01 „	—	—
125 „	28,04 „	74,05 „	26,43 „	75,66 „

Bevor wir diesen Versuch einer Diskussion unterziehen, wollen wir anschließend einen zweiten beschreiben, der nach diesem ersten rohen Vorversuch als Kontrollversuch angesetzt wurde, und der die obwaltenden Verhältnisse deutlicher erkennen läßt.

Versuch IV.

Serumlösung: 50 ccm mit 189,9 mg N.
Trypsinlösung: 10 ccm (Trypsinmenge I) = 23,01 mg N.
Sodalösung: 0,85 Proz.; Gesamtvolumen: 100 ccm.

Zeit	Trypsinmenge	Genuines Serum		Inaktiviertes Serum	
		Verdaut	Unverdaut	Verdaut	Unverdaut
1 Tag	II	31,00 Proz.	68,25 Proz.	70,60 Proz.	29,83 Proz.
2 Tage	II	57,45 „	43,86 „	70,79 „	28,55 „
3 Tage	II	63,61 „	37,08 „	71,58 „	28,88 „
4 Tage	II	70,69 „	30,59 „	71,77 „	28,28 „
4 Tage	I	11,14 „	90,58 „	58,62 „	40,68 „
1 Tag	I	5,51 „	94,17 „	48,23 „	52,31 „
1 Tag	II	31,00 „	68,25 „	70,60 „	29,83 „
1 Tag	IV	53,24 „	47,40 „	75,75 „	24,15 „
4 Tage	I	11,14 „	90,58 „	58,62 „	40,68 „
4 Tage	II	70,69 „	30,59 „	71,77 „	28,28 „

Versuch IV B.

Serum: wie vorher.
Trypsinlösung (neu), jedesmal 20 ccm mit 6,27 mg N.
Volumen usw. wie oben.

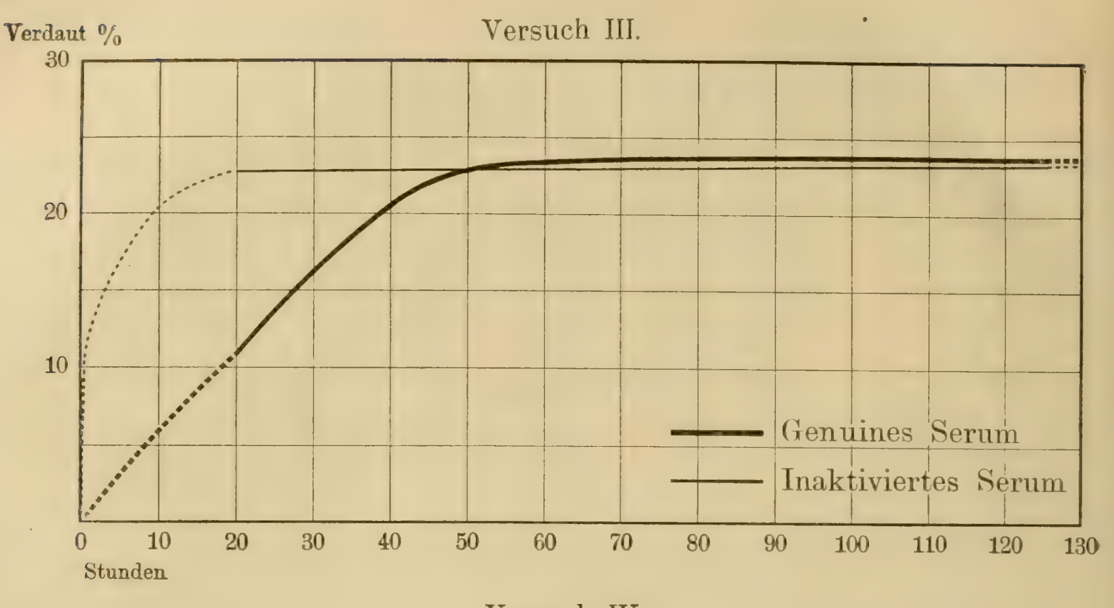
Zeit	Bem.	Genuines Serum Verdaut	Genuines Serum Unverdaut	Inaktiviertes Serum Verdaut	Inaktiviertes Serum Unverdaut
3 Tge.		28,25 Proz.	77,09 Proz.	75,12 Proz.	28,03 Proz.
6 „		39,54 „	64,41 „	81,31 „	
12 „		(etwa 40,00 Proz.)	63,94 „	(etwa 79,00 Proz.)	23,72 „
12 „	am 6. Tage mit 20 ccm neuer Trypsinlösung versetzt.	>79,00 „	—	79,41 „	—

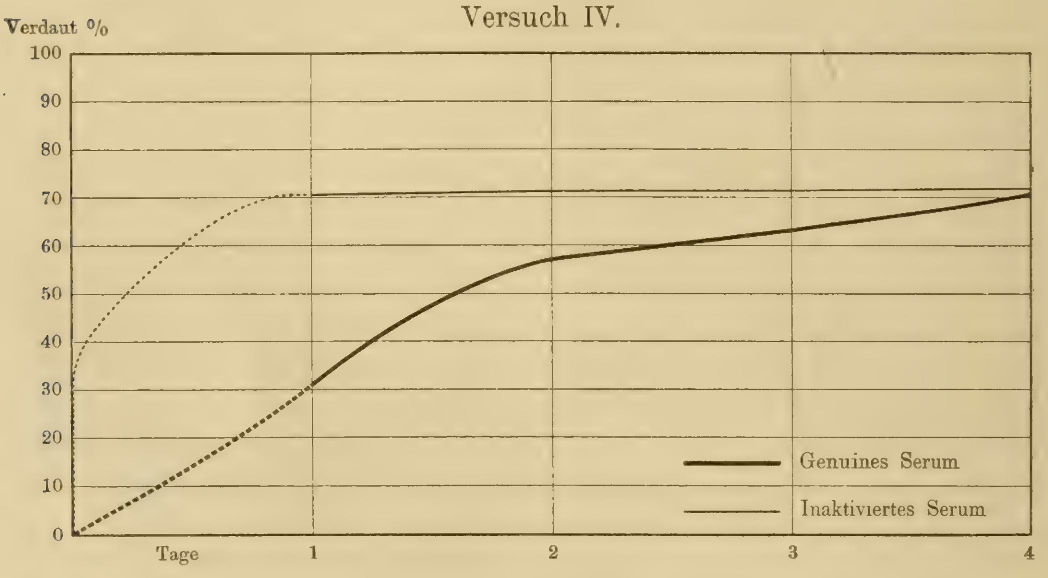
Aus diesen sämtlichen Versuchen geht übereinstimmend hervor, daß „inaktiviertes“ Serum von Trypsin glatt seiner Koagulierbarkeit bis zu einem gewissen Punkte beraubt wird, also ein Teil des genuinen Serums nach dem Inaktivieren der tryptischen Verdauung keinen nennenswerten Widerstand mehr entgegensetzt, verglichen mit dem vollständig nativen Serum. Von jenem „Endpunkte“ ab schreitet die Verdauung nur langsam fort, ebenso langsam fast wie beim genuinen Serum. Auch dieses erreicht jenen Endpunkt mit den gleichen Fermentmengen wie das inaktivierte, allerdings in viel längerer Zeit. Viel besser und charakteristischer als die Zahlen zeigt umstehende graphische Darstellung obiger Versuche die obwaltenden Verhältnisse. Der erst steile, dann immer mehr horizontale Verlauf gibt ein gutes Bild für die erst rasch fortschreitende, dann langsamer werdende und schließlich ganz versiegende Aufspaltung des nativen Eiweißes.

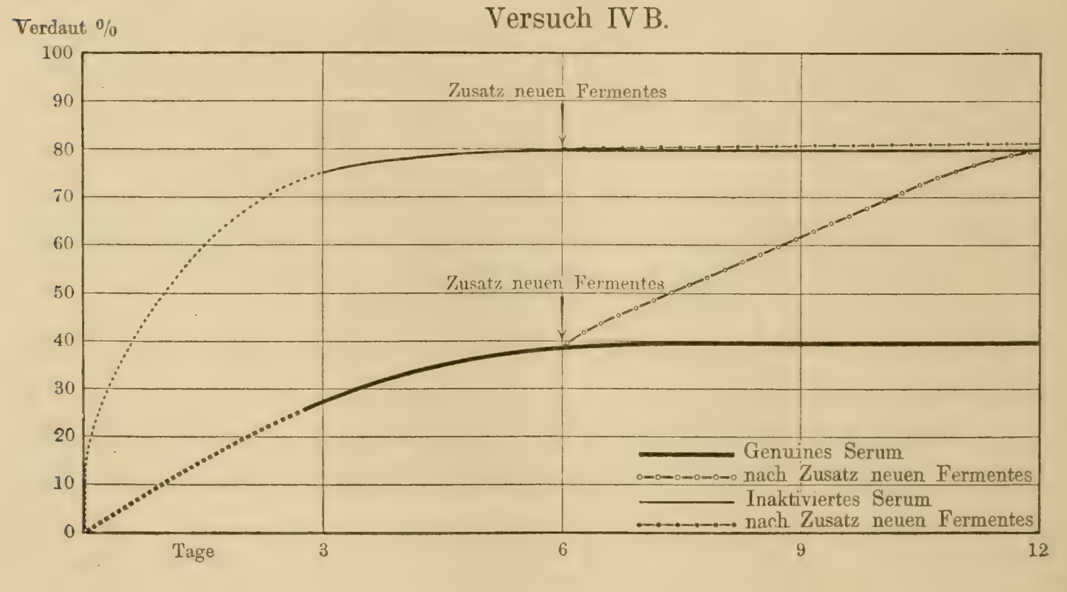
Es zeigt sich ferner, daß jener „Endpunkt“ in einem gewissen Grade von der Fermentmenge abhängig ist, mit ihrem Wachsen sich immer mehr nach oben verschiebt, bis es schließlich gelingt, (s. Versuch I) durch genügend große Fermentmengen die Resistenz des restierenden Teils des Eiweißes ebenfalls fast gänzlich zu brechen. Hinzuzufügen wäre noch, daß (s. Versuch IV B) es mit ungenügenden Fermentmengen nicht gelingt, sämtliches Eiweiß zu verdauen, daß selbst eine neue Zugabe von Ferment in zwölf Tagen den „Endpunkt“ nicht überwindet.

Es lassen sich folgende Tatsachen aus diesen letzten Versuchen feststellen:

Inaktiviertes Serum wird in kürzester Zeit auch mit kleinen Fermentmengen bis zu einem Endpunkte verdaut; von hier ab


Versuch III.
Verdaut %
30
20
10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Stunden
Genuines Serum
Inaktiviertes Serum


Versuch IV.
Verdaut %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Tage
1
2
3
4
Genuines Serum
Inaktiviertes Serum


Versuch IV B.
Verdaut %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Tage
3
6
9
12
Zusatz neuen Fermentes
Zusatz neuen Fermentes
Genuines Serum
nach Zusatz neuen Fermentes
Inaktiviertes Serum
nach Zusatz neuen Fermentes

steigt die Verdauung nur noch minimal an; ist die Fermentmenge zu klein, so erreicht die Verdauung nicht sofort den Endpunkt, strebt ihm aber sehr schnell zu, viel schneller als beim genuinen Serum. Diese Tatsache berechtigt uns wohl im Anfang ein allmähliches, kein plötzliches Ansteigen der Verdauung anzunehmen, wie wir es in den Kurven angedeutet haben.

Genuines Serum wird langsam angegriffen, in der Schnelligkeit hauptsächlich, in dem Maße, wie weit der Angriff erfolgt, allein von der Fermentmenge abhängig. Auch hier ist jener „Endpunkt" zu konstatieren, doch tritt er nicht so deutlich hervor. Da das Ansteigen der Verdauung überhaupt ein langsames ist, fällt es nicht so stark ins Auge, daß auch hier, wie beim „inaktivierten" Serum, eine erst stärkere, dann immer geringer werdende Abnahme der Koagulationsfähigkeit stattfindet.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde ein Serum benutzt, das durch eine sehr geringe Einwirkung von Pepsin-HCl vorbehandelt war.

Versuch V.

300 ccm Serum, mit 0,2 g Pepsin in 0,3 proz. HCl-Lösung drei Tage lang bei etwa 10° C. verdaut, bis die biologische Präzipitierbarkeit durch Immunserum von einem Kaninchen fast Null geworden, dann schwach alkalisch gemacht, mit dem gleichen Volumen 0,8 proz. NaCl verdünnt.

Zu jedem Versuch 10 ccm Serumlösung mit 52,74 mg noch koagulablem und 22,74 mg schon verdautem Stickstoff. Als Vergleich diente der Verdauungsversuch III mit genuinem Serum. Trypsinlösung wie III, desgl. Volumen. Angaben in Proz. des noch koagulablen Stickstoffs!

	Genuin		Peptisch vorverdaut	
Zeit (Std.)	Verdaut	Unverdaut	Verdaut	Unverdaut
20	11,41 Proz.	88,38 Proz.	47,44 Proz.	47,56 Proz.
45	—	—	60,77 Proz.	43,91 Proz.
48	25,68 Proz.	75,01 Proz.	—	—
125	28,04 Proz.	74,05 Proz.	61,38 Proz.	40,55 Proz.

Dieser Versuch zeigt, daß schon nach einer schwachen Pepsinverdauung auch das noch koagulierbar gebliebene Eiweiß durch Trypsin in kurzem erheblich leichter seiner Koagulierbarkeit beraubt wird als natives Eiweiß.

Da die Menge des auch nach dem Inaktivieren noch resistent gebliebenen Teils des Serums eine annähernd konstante war,

prüften wir bei dem besonders gut gelungenen Versuch IV, ob vielleicht jener Anteil mit einer der verschiedenen Serumfraktionen identisch war. Ein Versuch ergab:

Versuch VI.

Serumlösung: 50 ccm. Nach dem Inaktivieren leicht verdaulicher N: etwa 135 bis 140 mg.

In 50 ccm derselben Serumlösung Albumin-N:

Gefunden: I: 140,22 mg.

„ II: 153,00 mg.

Der Albuminstickstoff wurde bestimmt, indem das Globulin mit Natriumsulfat*) ausgefällt und ein aliquoter Teil des Filtrats nach Kjeldahl verbrannt wurde; der Versuch wurde wiederholt.

An diesen so gewonnenen Serumeiweißfraktionen wurde nun ein vergleichender Verdauungsversuch angestellt, wobei gleichzeitig auch hier der Einfluß des Erhitzens auf 68 bis 70° geprüft wurde.

Versuch VII.

Globulin: Durch 19 Proz. wasserfreies**) Natriumsulfat zweimal umgefällt, schwefelsäurefrei dialysiert.

Probe: 50 Proz. Ammonsulfat, im Filtrat Eiweiß fast = 0.

Albumin: Filtrate dieser Fällungen noch einmal mit 20proz. Na_2SO_4 gefällt, schwefelsäurefrei dialysiert. (12 Tage.)

Probe: Bis 52 Proz. Ammonsulfat keine Trübung. Beide Lösungen mit 10 g NaCl auf 1000 ccm aufgefüllt. Zu jedem Versuch: 75 ccm.

Albumin: 56,4 mg koagulabler N

Globulin: 72,27 „ „ „

Trypsinlösung:

Menge I (5 ccm: = 6,12 mg N).

Angaben in mg N, (bei dem Beginn des Versuchs noch koagulablen N, abzüglich Trypsinfiltrat-N).

Trypsin	Zeit		Albumin Verdaut	Albumin Unverdaut	Globulin Verdaut	Globulin Unverdaut	Reihe
I	4	Genuin.	8,04	43,62	25,77	43,2	1
II	2	Genuin.	16,08	25,08	17,37	46,20	2
IV	1	Genuin.	16,86	22,62	14,64	37,86	3
I	4	Inakt.	18,84	35,64	34,34	23,64	1a
II	2	Inakt.	—	—	21,75	42,06	2a
IV	1	Inakt.	—	15,42	—	34,62	3a
I	1	Genuin.	8,04	43,44	6,36	67,56	4

*) Hopkins und Pinkus, Journ. of physiol. 27 (1901).

**) Hopkins und Pinkus loc. cit.

Es zeigt sich kein nennenswerter Unterschied in der Verdaulichkeit.

Will man diesen Versuch nicht für ganz wertlos halten, so ist vielleicht höchstens daraus zu ersehen, daß Albumin die Eigenschaften des nicht zerlegten Serums wiederspiegelt. Diese Eigentümlichkeit des Albumins ist in anderen Fällen von anderen Forschern ebenfalls öfter beobachtet. Auf das Globulin dagegen scheint das Inaktivieren ohne nennenswerten Einfluß zu sein, eine Eigenschaft, die sich allerdings mit den vorher beim Gesamtserum erhaltenen Resultat gut in Einklang bringen ließe. Indessen lassen sich irgendwelche wichtigen Schlüsse aus dem Verhalten der präparativ hergestellten Eiweißstoffe des Serums nicht ziehen. Wir werden darauf am Schlusse der Arbeit nochmals zurückkommen.

Zusammenfassung und Diskussion der Resultate.

Aus diesen Versuchen geht folgendes hervor:

Das genuine Serum zeigt eine erhebliche Resistenz gegen die Einwirkung des Trypsins, ausgedrückt in der Erhaltung der Koagulationsfähigkeit eines Teiles des Eiweißes.

Diese Resistenz geht zum größten Teile verloren, wenn man das Serumeiweiß durch Koagulation seiner Genuinität beraubt.

In geringerem Maße bewirkt dasselbe eine sehr kurze Vorbehandlung mit Pepsinsalzsäure, die an sich die Koagulation nur wenig beeinträchtigt.

Im genuinen Serum widersteht ein annährend konstanter, erheblicher Teil des koagulablen Eiweißes der Trypsinverdauung und wird auch bei längerer Einwirkung des Fermentes und bei Zusatz neuer Fermentmengen nicht weiter beeinflußt.

Jedoch ist dabei der Vorbehalt zu machen, daß es sich bei diesen Versuchen um relativ kurze Zeiten (in maximo zwölf Tage) und nicht sehr große Enzymmengen handelt. Wie wir aus früheren Versuchen (Michaelis und Oppenheimer loc. cit.) wissen, gelingt es meist, durch Anwendung ungeheurer Enzymmengen und sehr langer Zeiten (bisweilen vieler Monate) auch genuines Serum restlos (bis zum Verschwinden der Biuretreaktion) aufzuspalten. Es handelt sich also auch hier nur um eine sehr weitgehende, aber nicht um eine absolute Resistenz. Vermutlich spielt bei den langen Zeiten die Wirkung des Alkalis eine unterstützende Rolle, worauf wir unten zurückkommen werden.

Die Menge des in diesem Sinne als resistent anzusehenden Eiweißes entspricht fast genau der Menge der Globuline des Serums, wie sie die Fraktionierung mit Hilfe von Natriumsulfat anzeigt. Man könnte deshalb auf die Vermutung kommen, daß es ausschließlich die Globuline sind, die vom Trypsin nicht angegriffen werden, wie denn Rostoski*) die Globuline als schwer angreifbar bezeichnet. So wahrscheinlich diese Annahme ist, so ist es doch nicht möglich, sie einwandsfrei zu begründen. Wenn man nämlich die Eiweißstoffe darstellt, die man gemeinhin als Serumalbumin und Serumglobulin bezeichnet, so ist ein so auffallender Unterschied in der Resistenz dieser Präparate gegen Trypsin nicht zu konstatieren, daß man daraus jene Annahme bekräftigen könnte (s. Versuche).

Aber ebensowenig kann man aus dem unbefriedigenden Ausfall dieser Analysen darauf schließen, daß die Vermutung falsch ist, daß das genuine Serumglobulin doch der Träger der Resistenz ist.

Man kann sich eben der Annahme nicht verschließen, daß die Manipulationen, die man zur Gewinnung dieser Präparate vornehmen muß, die Einwirkung gesättigter Salzlösungen, die Dialyse usw., doch einen leicht verändernden Einfluß auf die nativen Eiweißstoffe haben, und daß man aus diesen künstlich hergestellten Stoffen nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf die Verhältnisse im frischen Serum machen kann. Wenn man bedenkt, daß Koagulation des Serumeiweißes die Resistenz sofort aufhebt, und andererseits, wie schnell jene künstlichen Präparate ihre Löslichkeit verlieren, in einen dem koagulierten ähnlichen Zustand übergehen, so wird man auf diese Vergleichung wenig Gewicht legen. Für Veränderungen in der Struktur bei den Aussalzungen sprechen auch die Beobachtungen über Sulfatbildung beim Ausfällen von Serumeiweiß mit Ammonsulfat (Moerner)**) und die Fixierung neuer Fällungsgrenzen beim Serumalbumin (Oppenheimer).***)

Kurzum, es ist nicht unwahrscheinlich, daß tatsächlich das genuine Serumglobulin der Träger der Resistenz ist, ein Beweis dafür oder dagegen hat sich bisher aber nicht erbringen lassen. Es harmoniert diese Vermutung mit der vielfach vertretenen Ansicht, daß die Globuline in erster Linie die biologische Funktion, die Albumine mehr die des Nahrungseiweißes erfüllen sollen, wofür

*) Rostoski, Vorl. Mittlg. in der Münch. med. Wochenschrift 1903. (Sitzungsber. d. Würzb. Phys. Med. Soz.)

) Moerner, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. Zeitschrift f. physiol. Chemie **36, 247 (1902).

***) Oppenheimer, Über Fraktionierung des Serumalbumins. Verhandl. d. physiol. Gesellsch. Berlin. Novbr. 1902.

der Zusammenhang aller möglichen aktiven Zellstoffe, Toxine, Fermente, Antikörper mit den Globulinen herangezogen wird, sowie die Beobachtung, daß bei hungernden Schlangen das Albumin aus dem Blute verschwindet, während das Globulin zurückbleibt*).

Ein in dieser Hinsicht von uns am Kaninchen angestellter Versuch ergab nicht das erhoffte Resultat.

Auch nach sechstägigem Hunger, bei dem das Tier 17 Proz. seines Körpergewichts verlor, betrug der Albumingehalt noch etwa 70 Proz. des Blutes, wie bei einem Kontrolltier in gutem Ernährungszustande. Bei längerem Hungernlassen starb ein Tier am zehnten Tage. Weitere Versuche sind in Aussicht genommen, um diese Frage zu untersuchen.

Sehen wir also von der bislang nicht zu entscheidenden Frage ab, ob es die Globuline des unveränderten Serums sind, die der Trypsinverdauung Widerstand entgegensetzen, so mußte durch weitere Versuche die Beziehung zwischen der Genuinität als solcher und der Resistenz, und andererseits die Beziehung zwischen dem Antitrypsin und der Resistenz der Aufklärung näher gebracht werden.

Ein Mittel, das die Genuinität des nativen Serumeiweißes wenigstens in einer Richtung aufhebt, ist eine leichte Andauung mittelst sehr geringer Pepsinmengen. Wie L. Michaelis**) zeigte und andere Untersucher (Obermayer und Pick***), Rostoski†) bestätigen konnten, geht die Präzipitierbarkeit normaler Sera durch ihr reziprokes Präzipitin bald verloren, noch bevor die Koagulationsfähigkeit merklich beeinträchtigt ist. Der Verlust dieser für genuine Eiweißstoffe charakteristischen Funktion zeigt also leichte Veränderungen des chemischen Zustandes an, wenigstens darf man dies in dem Falle annehmen, wenn man die präzipitinverbindende Gruppe als zum Eiweißmolekül selbst gehörig ansieht (cfr. Michaelis und Oppenheimer loc. cit.).

Der oben angeführte Versuch mit pepsinangedautem Serum ergibt nun in der Tat eine beträchtliche Verminderung der Resistenz. Durch eine sehr geringe Einwirkung von Pepsin wird also der Angriff des Trypsins wesentlich verstärkt.

---

*) Bunge, Lehrbuch der physiol. Chemie 2, 255f.

**) L. Michaelis, Untersuchungen über Eiweißpräzipitine. Deutsche med. Wochenschrift 1902.

***) Obermayer und Pick, Biolog. Studien über das Eierklar. Wiener klin. Rundschau 1902, 15.

†) Rostoski, Habil. Schrift. Würzburg 1902.

Dieses Ergebnis ist nach anderen Richtungen ebenfalls nicht ohne Interesse. Die Tatsache, daß das Pepsin das Eiweiß gegen Trypsin empfindlicher macht, stützt auch andererseits unsere Annahme, daß die bindende Gruppe für das Präzipitin, die dabei zuerst verloren geht, tatsächlich dem Eiweißmolekül selbst angehört. Fernerhin ist die Leichtverdaulichkeit peptisch angedauten Serums für die physiologische Frage der doch zweifellos völligen Ausnutzung des Serumeiweißes im Organismus interessant, da diese Reihenfolge der Einwirkung den physiologischen Eingriffen des Organismus im Magen und Darm entspricht.

Für die Frage nach der Bedeutung des Antitrypsins ist auch dieser Befund nicht entscheidend. Obwohl es nahe liegt, anzunehmen, daß die Leichterverdaulichkeit des mit Pepsin vorbehandelten Serums die Annahme eines Antitrypsins als überflüssig erscheinen lassen könnte, so ist doch andererseits nicht von der Hand zu weisen, daß diese Vorbehandlung das Antitrypsin gerade so zerstören könnte, wie die Erhitzung bis zur Koagulation.

Kommen wir nun zu der schwierigsten Frage, der nach der wirklichen Anteilnahme des Antitrypsins, so ist dabei folgendes zu bemerken:

Unsere Versuche geben uns keinen Grund, an der Annahme eines Antitrypsins im Blutserum zu zweifeln, dessen Existenz von mehreren Forschern als erwiesen angesehen wird. Wir können sogar mit einiger Sicherheit annehmen, daß auch gegen die Verdauung des Serums selbst das Antitrypsin wirksam ist.

Etwas anderes ist aber, ob das Antitrypsin allein die Resistenz des genuinen Serums verschuldet. Zur Prüfung dieser Frage kann man zwei Wege einschlagen: Da das Antiferment stöchiometrisch wirken soll, so kann es nur eine bestimmte Fermentmenge neutralisieren; sobald diese Grenze überschritten ist, muß das überschüssige Ferment keinen Widerstand mehr vorfinden. Wie Ehrlich*) für die Beziehungen zwischen Antitoxin und Toxin den Grenzwert der völligen Neutralisation (L_0) eingeführt hat, so muß ein limes Null auch für die gegenseitige Bindung zwischen Ferment und Antiferment existieren. Die Kurven müßten demzufolge einen Sprung aufweisen: sie müßten oberhalb des Fermentwertes L_0 rapide ansteigen; infolgedessen dürfte außerdem das Schütz-Borissowsche Zeitgesetz der tryptischen Wirkung für antitrypsinhaltige Eiweißlösungen nicht stimmen.

*) Ehrlich, Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums. Klinisches Jahrb. 6 (1897), cfr. auch Oppenheimer, „Die Bakteriengifte" in Wassermann-Rolle, „Handb. d. pathogenen Mikroorganismen". Jena 1902, 1.

Das zweite Mittel ist die Vernichtung des Antitrypsins durch Mittel, die die Genuinität des Eiweißes nicht antasten; als solches haben wir das Erwärmen auf 68° gewählt. Ein solches „inaktiviertes“ Serum mußte, wenn nur das Antitrypsin die Wirkung des Fermentes hemmte, ohne Schwierigkeit der Trypsinverdauung unterliegen.

Die Versuche in bezug auf den ersten Punkt haben nichts Entscheidendes ergeben. Die Verdauung des genuinen Serums zeigt keinen deutlichen Sprung in der Kurve, und auch die Abweichungen vom Zeitgesetz sind nicht ausgesprochen genug, um die Existenz eines hier wirksamen Antifermentes zu erweisen oder auszuschließen. Das Zeitgesetz hat nach unseren Versuchen beim genuinen Serum für größere Fermentmengen annähernde Giltigkeit, für kleinere nicht. Das spricht wohl für die Existenz eines Antitrypsins, das kleinere Fermentmengen neutralisiert, bei größeren aber in den Hintergrund tritt. Wenn aber das Antitrypsin nur wenig Trypsin abzulenken im stande ist, so kann diese Wirkung in den Anfangsteilen unserer Kurven unerkannt bleiben. Aber dann ist eben die Menge des wirksamen Antitrypsins zu gering, um die Resistenz des genuinen Serums zu erklären, und wir müssen nach weiteren Ursachen für diese Resistenz forschen. Und darauf allein kommt es bei diesen Versuchen an, die ja, wie gesagt, die Existenz eines Antitrypsins gar nicht in Zweifel ziehen sollen.

Das seines Antitrypsins beraubte, bei 68° „inaktivierte“ Serum zeigte nicht eine quantitativ erhebliche Resistenzverminderung. (Versuch III und IV.)

Ceteris paribus wurde bei Anwendung gleicher Trypsinmengen nach einer gewissen Zeit ein gleicher Anteil des Serumeiweißes unangegriffen gefunden. Eine ausschlaggebende Wirkung des Antitrypsins ist also hier nicht anzunehmen.

Wohl aber zeigt sich ein bemerkenswerter Unterschied, wenn man die ersten Stadien betrachtet. Es zeigt sich eine deutliche Verzögerung in der Angreifbarkeit. Das genuine Serum erreicht langsam, erst nach mehreren Tagen, einen Punkt, den das inaktivierte schon nach 24 Stunden erreicht hat. Wie diese Tatsache zu erklären ist, wagen wir nicht zu entscheiden; es ist durchaus plausibel, für diese ersten Stadien der Verdauung die Hemmung durch das Antitrypsin des genuinen Serums in den Vordergrund zu stellen und etwa anzunehmen, daß das ursprünglich wirksame Antiferment binnen vier Tagen bei Bruttemperatur zerstört wird.

Doch im Falle dieser Annahme tritt dann um so mehr die Frage hervor, worauf denn die dann bestehende Resistenz beruht. Nicht auf einer Vernichtung des Trypsins. Abgesehen davon, daß vier Tage für die Wirksamkeit eines guten Präparates, wie die Kontrollen an leicht verdaulichen Eiweißstoffen zeigen, eine ausreichende Frist sind: unsere Versuche zeigen ja, daß auch neuer Fermentzusatz in mäßigen Grenzen während kurzer Zeiten nichts mehr am Resultate ändert. Es sei hier, um Mißverständnissen vorzubeugen, nochmals daran erinnert, daß übergroße Fermentmengen und sehr lange Zeiten schließlich allerdings zumeist auch diesen Widerstand besiegen.

Wir dürfen also aus unseren Versuchen den Schluß ziehen, daß die Existenz eines Antitrypsins allein nicht die Resistenz des genuinen Serums gegen Trypsin zu erklären vermag.

Es muß also in der chemischen Eigenart des genuinen Serumeiweißes der Hauptgrund für seine Schwerangreifbarkeit liegen.

Wenn wir uns auf den Boden stellen dürfen, daß die Fermente in ihrer spezifischen Wirkungsart gewisse theoretisch wichtige Analogien mit den Toxinen aufweisen, so dürfen wir es wagen, über die Ursache dieser Erscheinung einige Vermutungen zu äußern.

Wie für die Toxine nach den Annahmen der Ehrlichschen Seitenkettentheorie bestimmte Angriffspunkte notwendig sind, ohne die eine Wirkung nicht eintritt, so könnte man auch für die spezifische Wirkung der Fermente ähnlich beschaffene Angriffspunkte voraussetzen. Der eine von uns hat an anderer Stelle*) das Für und Wider einer solchen Hypothese ausführlich auseinandergesetzt und gezeigt, daß sie zwar manche sehr große Schwierigkeiten darbietet, aber andererseits, wenn man sie rein heuristisch auffaßt, einen gewissen Wert haben kann.

Man könnte sich dementsprechend vorstellen, daß ein Teil der Eiweißstoffe des genuinen Serums — nach den oben gegebenen Daten vielleicht die nativen Globuline —, sehr arm an solchen sterisch bestimmten Angriffspunkten für das Trypsin ist, während durch die leicht eingreifenden Manipulationen, die ihn seiner Genuinität berauben, diese Angriffspunkte in größerer Zahl frei werden. Solche Eingriffe sind die Koagulation, die Andauung durch Pepsinsalzsäure, das Umfällen mit konzentrierten Neutralsalzen. Bei allen diesen Vorgängen wirken Elektrolyte auf die

*) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. II. Aufl. Leipzig 1903.

kolloidale Eiweißsubstanz ein; und man darf wohl annehmen, daß es schon hier zum Eintritt von Wasser, zu Hydratisierungen, kommt, die Atomgruppierungen, die vorher ineinander gekettet waren, frei macht. Es ist die Annahme nicht von der Hand zu weisen, daß gerade im genuinen Serumeiweiß die spezifischen Gruppen an einander gekettet sind, sodaß das Ferment nicht eingreifen kann, während sie nach der Hydratisierung frei und bindungsfähig werden.

In ähnlicher Weise müssen in langen Zeiträumen die Elektrolyte der schwachen Sodalösungen, mit denen man die Verdauungsgemische stehen läßt, verändernd einwirken, wie ja auch ohne jedes Ferment Eiweißkörper bei langem Stehen mit Wasser schließlich zerfallen (Salkowski). So wäre zu erklären, daß schließlich das Ferment auch das genuine Eiweiß völlig aufspaltet. Daß diese „spezifische Bindung“ für die Wirkung der Fermente und auch besonders des Trypsins eine absolut ausschlaggebende Rolle spielt, hat Henri*) neuerdings energisch verfochten, der auf Grund physikalisch-chemischer Messungen auch speziell bei der Trypsinspaltung**) zu dem Ergebnis gelangte, daß die Hydrolyse eine mittelbare Katalyse (catalyse médiate) ist, die sich durch Bindung des Enzymes an das Substrat und Zerfall der entstandenen lockeren Verbindung vollzieht. Er nimmt also auch in den verdaulichen Eiweißkörpern eine solche spezifische Bindung des Ferments an passende Atomgruppierungen an.

Ob diese spezifisch bindenden Gruppen in Zusammenhang stehen mit den im Eiweißmolekül supponierten Aminogruppen, die in den intakten Molekülen fest gebunden sind, sei es durch Aldehyd- oder Carbonylgruppen (Loew***), Hofmeister†), sei dahingestellt. Jedenfalls sei im Hinblick darauf die Tatsache erwähnt, daß die Verbindungen der Eiweißkörper mit Aldehyden, die also eventuell sich an die Aminogruppen kuppeln, nach Schwarz††) gegen die Trypsinverdauung absolut resistent sind.

Auch Schwarzschild†††), der bei Hofmeister fand, daß die Curtiussche Base durch Trypsin spaltbar ist, nimmt die spezi-

---

*) Henri, Lois générales de l'action de quelques diastases. Paris 1903.

**) Henri, Soc. Biol. 55 (12. VII. 1903.)

***) Loew, Eine Hypothese über die Bildung des Albumins. Pflügers Archiv 22, 503 (1880).

†) Hofmeister, Über Bau und Gruppierung der Eiweißkörper. Asher-Spiro, Ergebnisse I, 1 (1902).

††) Schwarz, Über Verbindung der Eiweißkörper mit Aldehyden. Zeitschrift f. physiol. Chemie 31, 460 (1901).

†††) Schwarzschild, Über die Wirkungsweise des Trypsins. Diese Beiträge 4, 155 (1903).

fische Konfiguration der gekuppelten Aminosäuren als ausschlaggebend für die Angriffsfähigkeit des Trypsins an.

Andererseits findet sich nach E. Fischer und Abderhalden*) in jedem Eiweißkörper, der nicht zuvor anderweitig verändert ist, eine noch ziemlich komplexe Gruppe, ein Polypeptid, das noch sämtliche Aminosäuren gebunden enthält, und gegen Trypsin absolut resistent ist. Damit erhält die alte, fast gestürzte Kühnesche Lehre vom Antipepton, das gegen Trypsin resistent ist, eine neue exakte Begründung.

Daraus geht jedenfalls hervor, daß es Konstellationen im Eiweißmolekül gibt, die zwar an sich, z. B. durch Säuren, leicht hydrolytisch spaltbar sind, aber dem Trypsin keine Angriffspunkte darbieten. Und so darf man denn wohl ohne theoretische Bedenken sich der Ansicht zuneigen, daß unter Umständen auch größere Komplexe innerhalb des Eiweißmoleküles, die noch die Eigenschaft der Koagulation besitzen, derartiger Angriffspunkte entbehren, daß diese Komplexe aber schon durch leichte Eingriffe, ja selbst durch die langsame Wirkung der schwachen Alkalien so verändert werden, daß nunmehr die nötigen Angriffspunkte für das Trypsin frei werden.

Derartige Konfigurationen sind auch schon für einfachere Stoffe angegeben worden. Nach Bourquelot**) ist die Gentianose, ein Trisaccharid, durch Emulsin unangreifbar; wenn es aber durch Invertase in Glykose und Gentiobiose gespalten ist, wird letztere leicht von Emulsin weiter gespalten. Noch ähnlicher unseren Verhältnissen ist die Resistenz der Mannane gewisser Palmen gegen die Wirkung der Seminase, die zahlreiche andere Mannane ähnlicher Natur aufspaltet. Bourquelot***) gelang es aber, durch vorsichtiges Behandeln mit kalter Schwefelsäure das Mannan ohne sichtliche Aufspaltung so zu verändern, daß es nunmehr durch Seminase glatt aufgespalten wurde. Es gelang ihm dann später†) in den Samen von Phytelephas auch ein Enzym aufzufinden, das direkt auf das Mannan der Palmen wirkt, also eine Verwandtschaft zu den bindenden Gruppen besitzt, die den

---

*) E. Fischer und Abderhalden, Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente. Zeitschrift f. physiol. Chemie **39**, 81 (1903).

) Bourquelot, Sur l'hydrolyse des polysaccharides etc. Journ. Pharm. Chim. (6) **16, 578 (1903).

***) Bourquelot und Hérissey, De l'action successive des acides et des ferments solubles sur les polysaccharides. Soc. Biol. **55**, 567 (15. V. 03).

†) Bourquelot und Hérissey, Sur lé mécanisme de la saccharific. des mannanes etc. Soc. Biol. **55**, 629 (12. VI. 03).

gewöhnlichen Seminasepräparaten fehlt. Das Enzym von Phytelephas ersetzt also die Behandlung mit Schwefelsäure.

Fassen wir das Ergebnis kurz zusammen:

Das genuine Serum zeigt insofern eine Resistenz gegen die Trypsinverdauung, als ein beträchtlicher Teil seiner Eiweißstoffe lange Zeit hindurch seine Koagulationsfähigkeit behält.

Diese Eigenschaft geht durch vorherige Koagulation verloren, wird durch geringfügige Einwirkung von Pepsinsalzsäure erheblich geschwächt.

Erhitzen auf 68° verändert nur die Form der Kurve nicht die quantitativen Verhältnisse.

Die Wirkung eines Antitrypsins an sich ist nicht ausreichend, um diese Resistenz zu erklären; man muß eine spezifische Konfiguration des genuinen Serums, selbst annehmen.

Diese Konfiguration beruht wahrscheinlich auf dem Mangel an Angriffspunkten für das Ferment, die zur Ausbildung der intermediären Verbindung zwischen Ferment und Substrat nötig sind.

Das Zeitgesetz von Schütz-Borissow läßt sich beim genuinen Serum nicht mit Sicherheit auffinden. Es gilt annähernd nur für etwas größere Fermentmengen.

Unserem hochverehrten Chef, Herrn Prof. Zuntz, für sein lebhaftes Interesse an dieser Arbeit unseren ergebensten Dank auszusprechen, ist uns eine angenehme Pflicht.

XXVI.

Die Fällung von Kolloiden.

Von **K. Spiro.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

I.

Die Giltigkeit des Verteilungssatzes für die Aussalzung.

Die Fähigkeit der Eiweißkörper wie anderer Kolloide bei einer bestimmten Temperatur oder durch Zusatz gewisser Stoffe, z. B. Alkohole verschiedener Art, in eine unlösliche Modifikation überzugehen, zu „gerinnen", ist wohl das älteste Verfahren, das zu ihrer Abscheidung benutzt wurde; ein zweites Verfahren zur Abscheidung der Kolloide ist die Überführung in unlösliche Verbindungen durch chemische Eingriffe, indem man mit Hilfe von Ionenreaktionen unlösliche Salze darstellt. Diese Methoden haben wohl für analytische Zwecke eine besondere Bedeutung, können aber natürlich nicht zur Aufklärung über das physikalische Verhalten der Kolloidlösungen dienen.

Vergleichsweise spät hat man nach dem Vorgange von Denys, Heynsius, Hoppe-Seyler, Hammarsten, Kühne u. a. auch die Abscheidung durch Zufügung von Neutralsalzlösungen benutzt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß dabei eine Koagulation der Eiweißstoffe vermieden wird; weiter entwickelt ist es dann in der von Hofmeister eingeführten Methode der fraktionierten Salzfällung. Empirisch ist dieses Verfahren so vielfältig und mit so unzweideutigem Erfolg angewandt (man denke nur an die Fraktionierung der Bluteiweißkörper und der Albumosen), daß Zweifel an seiner Brauchbarkeit für eine große Anzahl von Fällen nicht bestehen; über das Wesen des Aussalzungsvorgangs liegen jedoch nur ganz wenige Untersuchungen vor.*)

---

*) Schulze, Journ. f. prakt. Chemie **25**, 431; **27**, 320. — Prost, Bull. de l'Acad. Roy. de Belg. 1887, 312. — Linder und Picton, Journ. Chem. Soc. **67**, 63. — Hardy, Zeitschrift f. physik. Chemie **33**, 385.

Wenn wir die bei der Aussalzung der Eiweißkörper resp. der Kolloide bisher gefundenen Tatsachen zusammenstellen, so fällt in erster Linie auf, daß das Phänomen ohne störende Nebenreaktion zumeist nur durch Neutralsalze, d. h. elektrolytisch dissoziable Verbindungen hervorgerufen werden kann. Das habe ich zuerst beim kolloidalen Eisenoxyd (Zuckerlösungen, Harnstofflösungen fällen nicht), Pauli dann in umfassenderer Weise bei den Eiweißkörpern festgestellt*).

Dabei rufen die Salzlösungen keine chemische Veränderung der Kolloide hervor, denn im Gegensatz zur Wirkung der Hitzekoagulation bleiben bei der Aussalzung die Kolloide zunächst unverändert und können durch Verdünnung wieder in Lösung gebracht werden. Wie wichtig dies für das Studium der Eiweißkörper geworden ist, braucht kaum hervorgehoben zu werden.

Da bei der Fällung mit Alkohol, Phenol, Aceton oder ähnlichen Stoffen („Alkoholfällung") Eiweiß leicht in eine nicht mehr lösliche Modifikation übergeht, so hat man die Salzfällung als etwas von der Alkoholfällung prinzipiell Verschiedenes angesehen und ist dazu gelangt, das Fällungsvermögen der Salzlösungen mit ihrer Ionisation, ihrer elektrischen Ladung, in Zusammenhang zu bringen. Man hat jedoch keinen ausreichenden Grund, die Alkoholfällung von der Salzfällung in der angegebenen Art zu unterscheiden: fällt man eine Lösung von kristallisiertem Serumalbumin mit Alkohol oder Aceton, so ist der entstandene Niederschlag zunächst noch vollkommen wasserlöslich, er geht nur ganz allmählich durch eine sekundäre Reaktion in eine unlösliche Modifikation über; die Geschwindigkeit, mit der diese sekundäre Reaktion eintritt, ist für die einzelnen Eiweißstoffe verschieden, z. B. für das kristallisierte Ovalbumin größer als für das kristallisierte Serumalbumin; für alle aber läßt sich zeigen, daß es sich um eine sekundäre Reaktion handelt.

Eine solche sekundäre Nebenreaktion tritt aber auch bei der Salzfällung sehr häufig ein. Kristallisiertes Ovalbumin, das längere

— Spring, Bull. de l'Acad. Roy. de Belg. 1900, 483. — Bredig, Anorganische Fermente S. 15. — Whitsey und Ober, Zeitschrift f. physik. Chemie **39**, 630. — Barus, Americ. Journ. of Science **37**, 122. — Bodländer, Nachr. d. Kgl. Ges. d. Wiss. Göttingen 1893, 267. — H. Freundlich, Zeitschrift f. physik. Chemie **44**, 129. — R. Höber, Physik. Chemie der Zellen und der Gewebe. Leipzig 1902. — Rothmund, V., Zeitschrift f. physik. Chemie **33**, 401.

*) Spiro, Über physikalische und physiologische Selektion. Straßburg, Verlag der Schmidtschen Univ.-Buchhdlg. — Pauli, W., Pflügers Archiv **78**, 315. — Diese Beiträge **2**, 1; **3**, 225 (zum Teil mit P. Rona).

Zeit mit neutraler oder schwach saurer Ammonsulfatlösung in Berührung war, wird zum Teil in Wasser unlöslich und ändert sich auch sonst in seinem Verhalten, z. B. Verdauungsfermenten gegenüber. Ebenso geht kolloidales Eisenoxyd bei der Fällung mit Salzen sehr schnell in das nicht mehr lösliche Oxyd über, schneller als z. B. Serumalbumin bei der Fällung mit Alkohol unlöslich wird.

Da die Löslichkeit des Fällungsproduktes, die Reversibilität des Fällungsprozesses, bisher allein zur Unterscheidung von Alkohol- und Salzfällung diente, so ist nach dem Gesagten diese Trennung prinzipiell nicht mehr zu rechtfertigen*); und wenn wir die beiden Methoden nicht als wesentlich verschieden anzusehen berechtigt sind, so dürfen wir auch nicht für die Erklärung der Salzfällung nur solche Momente heranziehen (Ionisation, Dielektrizitätskonstante), die für die Alkoholfällung nicht in Betracht kommen und daher auch für die Salzfällung nur als begleitende Momente aufzufassen sind.

Daß für die Wirkung der Salze nicht einfach molekulare Verhältnisse in Betracht kommen, ergaben bereits die ersten Versuche, ebenso daß die einzelnen Salze in ihrem Wirkungsgrad sehr erheblich differieren, Bittersalzlösung stärker wirkt als Kochsalzlösung, Ammonsulfat stärker als Bittersalz. Systematisch hat zuerst Hofmeister**) mit seinen Schülern diese Verhältnisse studiert und gewisse Gesetzmäßigkeiten gefunden, z. B. für ähnlich konstituierte Salze eine Beziehung zum Molekulargewicht festgestellt und damit den Vorgang als einen molekular-physikalischen erwiesen. Hofmeister konnte ferner zeigen, daß das Fällungsvermögen der Salze sich im allgemeinen additiv aus dem Fällungsvermögen der beiden Ionen zusammensetzt.

Einen neuerlichen sehr wesentlichen Fortschritt in dieser Frage verdanken wir W. Pauli. Durch die Untersuchung der fällenden Wirkung kombinierter Salzpaare konnte er feststellen, daß einzelne Salze auch die Fällung verhindern können, was ihn dazu führte, die Effekte der Ionen eines Salzes nicht als gleichsinnig, sondern als antagonistisch wirkende Größen zu betrachten; da die positiven H-Ionen Fällungsmittel sind, nimmt Pauli an, daß die Kationen der Salze fällen, die Anionen Fällung hindern, und daß sie sich dabei in folgende Reihen bringen lassen: Fällend: $Mg < NH_4 < K < Na < Li$; Hindernd: $CNS > J > Br > ClO_3 > NO_3 > Cl > CH_3\,COO >$ Tartr. $>$ Citr. $> PO_4 > SO_4 > Fl$.

*) Beide Fällungsmethoden zeigen auch in anderen Punkten Übereinstimmung, so wird sowohl die Alkoholfällung, als auch die Salzfällung von Eiweißkörpern durch Harnstoff gehemmt (Spiro, Pauli).

) Archiv f. experim. Path. u. Pharm. **25, 1; **27**, 295; **28**, 210.

Eine ganz ähnliche Reihenfolge und dieselbe spezielle Differenz zwischen den beiden Ionenarten hatte schon vorher Posternak*) festgestellt. An dem Eiweiß des Samens von Picea excelsa konnte er feststellen, daß dessen schwach alkalische Lösungen leichter durch Chloride als durch Bromide als durch Nitrate, als durch Jodide gefällt werden, während für die Kationen die Reihe lautet $NH_4 > K > Na$; umgekehrt war in der sauren Lösung $J > NO_3 > Br > Cl$ und $Na > K > NH_4$. Wie man sieht, findet in der alkalischen Lösung eine Umkehrung der Paulischen Reihenfolge der Kationen, in der sauren eine solche der Anionen statt.

Ebenso wie die Salze sich in ihrem Fällungsvermögen unterscheiden, tun dies auch die verschiedenen Eiweißstoffe in ihrer Fällbarkeit: die Fällungsgrenzen sind verschieden für die einzelnen Stoffe. Gesetzmäßigkeiten haben sich hierfür noch keine ergeben, da wir ja über die wichtigsten physikalischen Eigenschaften der Eiweißstoffe noch nicht unterrichtet sind; hervorgehoben mag nur das eine werden, daß diejenigen Stoffe, welche zu ihrer Lösung der Anwesenheit von Salzen bedürfen (Globuline, Heteroalbumose), auch am leichtesten durch Salze ausgefällt werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist endlich, daß die Fällungsgrenzen für einen und denselben Eiweißkörper nicht unerheblich von der Konzentration der Lösung abhängen. Darauf hat Hofmeister schon in seinen ersten Mitteilungen hingewiesen; es ist dieser Punkt nicht nur von hervorragend praktischer Bedeutung, sondern er zeigt uns auch, daß hier nicht einfache chemische resp. stöchiometrische Verhältnisse vorliegen. Konzentrierte Lösungen beginnen früher auszufallen als verdünnte; doch läßt sich bei allen Eiweißkörpern ziemlich bald ein Punkt erreichen, von dem an eine mehr oder weniger große Verdünnung auf die untere Fällungsgrenze ohne merklichen Einfluß ist.

Wie ist nun die Aussalzung zu erklären? Man spricht zunächst meist von „Entziehung des Lösungsmittels“ oder von „Löslichkeitsverminderung“. Daß eine solche Löslichkeitsverminderung eines Stoffes durch Gegenwart eines zweiten hervorgerufen werden kann, ist nicht nur eine Erfahrungstatsache, sondern ist eine einfache Folgerung, wenn wir den osmotischen Druck mit dem Dampfdruck nach van't Hoff in Analogie setzen. Nernst**) kam so zu der Formel $\frac{l-l^1}{l^1} = \frac{n}{N}$, wo l die Löslichkeit eines Körpers N in A, l^1 die nach Zufügung eines anderen Körpers, und

*) Annal. de l'Institut Pasteur 15, 85.
**) Zeitschrift f. physik. Chemie 4, 150; 6, 16.

n resp. N die Zahl der Molekel des gelösten Stoffes bzw. des Lösungsmittels ist; man kann also unter bestimmten Verhältnissen auf diesem Wege auch zu einer Molekulargewichtsbestimmung gelangen. So einfach liegen die Verhältnisse aber nicht immer. Fassen wir als Beispiel der Löslichkeitsverminderung die Ausfällung der Salze aus wässeriger Lösung mit Alkohol ins Auge: Bei steigenden Mengen Alkohol finden sich in 100 Teilen der Lösung

	0 Proz.	10 Proz.	20 Proz.	30 Proz. Alkohol
NaCl	26,4	22,2	18,4	14,9
Na_2SO_4	25,6	14,35	5,6	—
	40 Proz.	50 Proz.	60 Proz.	80 Proz. Alkohol
NaCl	11,7	8,9	5,6	1,2
Na_2SO_4	1,3	—	—	—

Man erkennt keine Beziehung der Löslichkeitsverminderung zum Weingeistzusatz, und wenn man annehmen wollte, der Alkohol entziehe dem Salz Wasser als Lösungsmittel, so kommt man zu folgenden Zahlen: Es sind an H_2O entzogen bei einem Gehalt von

	10 Proz.	20 Proz.	30 Proz.	40 Proz.	Alkohol
aus NaCl-Lösung	5,9	10,31	13,56	15,68	Teile
aus Na_2SO_4-Lösung	33,06	58,12	—	54,92	Teile
	50 Proz.	60 Proz.	80 Proz.	Alkohol	
aus NaCl-Lösung	16,29	18,79	16,38	Teile	
aus Na_2SO_4-Lösung	—	—	—	Teile.	

Ich habe diese Berechnung nur für diese beiden Salze angestellt, weil sie schon zur Genüge zeigt, daß die Ausfällung nicht nur auf einer der Alkoholmenge proportionalen Entziehung des Lösungsmittels beruhen kann. Ferner zeigt ein Vergleich der beiden Reihen, wie außerordentlich verschieden in beiden Fällen die Löslichkeitsverminderung ist, wie sehr die Form der Kurve von der Art des angewandten Salzes abhängt. Andere Salzlösungen werden durch Alkohol in zwei Schichten getrennt, von denen die eine eine konzentrierte Salzlösung mit wenig Alkohol, die andere konzentrierter Alkohol mit wenig Salz ist. Bekannt ist ja, daß man K_2CO_3 und $CaCl_2$ dementsprechend zur Reinigung der Alkohole anwendet. Wenn man sich von dem Vorgang ein Bild machen will, so muß man alle drei vorhandenen Stoffe betrachten. — Dazu führt uns auch folgende Überlegung: Brauche ich zur Lösung von a g Eiweiß b g Wasser, sind aber in einem bestimmten Volumen Ammonsulfatlösung C nur $\frac{b}{x}$ Wasser noch so vorhanden, daß sie zur Lösung des Eiweiß dienen könnten, so müßten sich doch die a g Eiweiß in

x. C Lösung lösen, z. B. ein zwischen 50 und 60 Vol.-Proz. Ammonsulfatlösung ausfallender Eiweißkörper sich auch in einer etwas größeren Quantität 60 Vol.-Proz. Ammonsulfatlösung auflösen lassen, usf. Gerade für die Aussalzung der Eiweißkörper hat sich aber ergeben, daß die absoluten Mengen der Lösungsmittel innerhalb gewisser Grenzen einflußlos sind.

Ein ganz ähnliches Verhalten finden wir nun bei der gleichzeitigen Wirkung zweier miteinander nicht mischbarer Lösungsmittel: Wenn wir Bernsteinsäurelösung mit Äther schütteln, so geht in den letzteren sechsmal soviel von der Säure über, gleichgiltig wie immer wir das Verhältnis von Äther und Wasser variieren, wie die folgende Tabelle Berthelots*) zeigt.

Wasser	Äther	Gehalt in Wasser C_1	Gehalt in Äther C_2	Teilungskoeffizient C_1/C_2
70	30	42,4	7,1	6,0
49	49	43,8	7,4	6,0
28	55,5	47,4	7,9	6,0

Nernst hat dem Verteilungssatz folgende Fassung gegeben: „Verteilt sich ein gelöster Stoff zwischen zwei einander nur wenig lösenden Flüssigkeiten, so ist im Gleichgewichtszustand bei gegebener Temperatur das Konzentrationsverhältnis des gelösten Stoffes ein von der Menge des letzteren unabhängiges, mit anderen Worten: der gelöste Stoff besitzt einen konstanten Teilungskoeffizienten, wenn ihm in beiden Lösungsmitteln gleiche Molekulargröße zukommt."

Nach den Versuchen Berthelots ist der Verteilungskoeffizient von der Temperatur und der Verdünnung abhängig, bei Bernsteinsäure z. B. wird er mit abnehmender Temperatur und steigender Verdünnung kleiner.

Daß es sich bei der Eiweißfällung um die Bildung zweier zunächst flüssiger Schichten handelt, davon kann man sich an geeignetem Material leicht überzeugen, der entstandene Niederschlag besteht aus feinen Tröpfchen (Globuliten), die je nach der Art des Eiweißkörpers, des umgebenden Mediums, der äußeren Bedingungen mehr oder weniger schnell in festen Zustand übergehen. Dies läßt sich nicht nur am Leim, sondern auch an anderen Eiweißkörpern, speziell den Albumosen, ganz besonders schön am Leimpepton zeigen.

*) Berthelot und Jungfleisch. (4) 26, 396. 1872.

Um nun die Geltung des Verteilungssatzes für die Proteidaussalzung zu prüfen, habe ich die Zusammensetzung der beiden Schichten untersucht.

Nach mannigfachen Vorversuchen habe ich als Eiweißkörper reinstes (nach Hammarstens Vorschrift von mir dargestelltes) Kasein, als Fällungsmittel Natriumsulfat (oberhalb 33°) benutzt. Das Kasein wurde mit wenigen Tropfen Soda in Lösung gebracht, der Gehalt der Lösung entsprach 9.72 Gewichtsprozent Kasein. Die durch 40 proz. Sättigung hervorgerufene Fällung wurde abzentrifugiert, schnell über Fließpapier getrocknet und analysiert. Das vorhandene Natriumsulfat wurde als Baryumsulfat zur Wägung gebracht, das Wasser durch Trocknen bei 105° bis zur Gewichtskonstanz bestimmt, das Kasein aus der Differenz berechnet; in einzelnen Fällen wurde der Eiweißgehalt durch Kjeldahl-Bestimmungen kontrolliert; bei der gefundenen hinreichenden Übereinstimmung wurde in allen Fällen der aus der Differenz der Gewichtsanalysen berechnete Wert angeführt. Jede Bestimmung wurde doppelt ausgeführt und das Mittel aus zwei gut übereinstimmenden Analysen angegeben. Da dem Verfahren naturgemäß eine Reihe von Fehlern anhaftet, wurden mehrere Reihen von Doppelversuchen angestellt.

Tabelle I.

Herstellung	Es ergab sich	H_2O Proz.	Natriumsulfat Proz.	Kasein Proz.
9,72 Proz. Kasein	Wasserschicht	77,40	21,42	1,18
+ 40 Proz. Na_2SO_4	Kaseinschicht	63,11	13,22	23,67
	Wasserschicht	77,21	19,21	3,58
" "	Kaseinschicht	61,17	11,55	27,28
	Wasserschicht	77,86	21,66	0,48
" "	Kaseinschicht	63,19	13,31	23,50
	Wasserschicht	77,68	18,04	4,28
" "	Kaseinschicht	60,87	10,24	28,89

Als Mittel ergibt sich aus diesen Versuchen:

Tabelle II.

	Wasser Proz.	Natriumsulfat Proz.	Kasein Proz.
Wasserschicht	77,54	20,08	2,38
Kaseinschicht	62,08	12,08	25,84

Die Versuche zeigen, daß bei der typischen Salzfällung eines Eiweißkörpers sich zwei Schichten bilden, die beide aber alle drei in Betracht kommenden Stoffe (Wasser, Salz, Eiweiß), in verschiedener Konzentration enthalten. Die obere Schicht enthält viel Wasser, viel Salz

und wenig Eiweiß, die untere weniger Wasser, weniger Salz und viel Eiweiß: ähnlich wie wir bei der Ausätherung einer ätherlöslichen Säure aus ihrer wässerigen Lösung zwei Schichten sich bilden sehen, von denen die obere viel Äther, viel Säure, wenig Wasser, die untere wenig Äther, wenig Säure, viel Wasser enthält.

Wir sehen ferner, daß die in der Kaseinschicht enthaltene Salzlösung nicht einfach dem Niederschlag adhäriert, da der Gehalt an Salz in der Kaseinschicht kleiner ist als in der wässerigen Schicht. Es erinnert dies an die Befunde Hofmeisters, der bei der Quellung von Leimplatten in Salzlösungen die Konzentration an Salz in den Leimplatten immer etwas niedriger fand als in der Außenflüssigkeit.

Da die Salzkonzentration in der Kaseinschicht sehr erheblich niedriger ist als in der Außenflüssigkeit, so kann endlich die Ausfällung nicht auf der Bildung einer Eiweißsalzverbindung beruhen.

Einige Versuche habe ich weiter in der Art angestellt, daß ich Kasein mit Salz bis zu 40 Proz. sättigte und die Mischung dann auf dem Wasserbad erhitzte, dabei schmolz die Kaseinschicht, wurde bei niederer Temperatur wieder fest, ohne daß aber das Kasein seine Löslichkeit in Wasser eingebüßt hätte. Das Resultat von zwei Versuchsreihen gibt folgende Tabelle:

Tabelle III.

	Wasser Proz.		Natriumsulfat Proz.		Kasein Proz.	
Wasserschicht	76,80	76,53	21,87	21,12	1,33	2,35
Kaseinschicht	44,06	45,89	8,63	9,06	47,31	45,05

Im Mittel:

Tabelle IV.

	Wasser Proz.	Natriumsulfat Proz.	Kasein Proz.
Wasserschicht	76,66	21,50	1,84
Kaseinschicht	44,97	8,84	46,18

Auch hier sehen wir wiederum: Verteilung aller drei Stoffe in beiden Schichten, Konzentration an Salz in der Kaseinschicht bedeutend geringer als in der Wasserschicht (8,84 g gegen 21,50 g in 100 g).

Untereinander unterscheiden sich die beiden Reihen dadurch, daß die geschmolzene und wieder erstarrte Kaseinschicht (Tab. IV) bedeutend eiweißreicher ist als die bei 35° C. hergestellte ent-

sprechende Schicht der Tabelle II. Betrachtet man die untere Schicht als (feste) Lösung, so kann man sagen, die Löslichkeit des Kaseins hat zugenommen, ähnlich wie nach Alexejeff die Löslichkeit der unter Wasser geschmolzenen Salizylsäure größer ist als die der kristallisierten.

Dabei haben Wasser- und Salzgehalt ziemlich in gleicher Weise in der Kaseinschicht abgenommen, das Verhältnis von Wasser zu Salz ist in Tabelle II = 5,139 : 1, in Tabelle IV = 5,084 : 1. Diese Übereinstimmung, die wohl nur zufällig einen so hohen Grad erreicht hat, ist als ein neuerlicher Beweis für die Konstanz der Fällungsgrenzen anzusehen. Jedenfalls ist bei den verschiedenen Temperaturen das Verhältnis Wasser zu Salz in der ausgefällten Schicht gleich, das Verhältnis Eiweiß zu Salz aber nicht; das, was ausfällt, kann also nicht eine Verbindung von Eiweiß und Salz sein.

Ähnlich wie beim Kasein läßt sich der Vorgang des Schmelzens auch bei der Gelatine verwenden, und ich habe daher mit dieser einige Versuche angestellt, um die Zusammensetzung beider Schichten bei verschiedenen Sättigungsgraden vergleichen zu können.

Die nach den Angaben der Kolumne I (Tabelle V) hergestellten Mischungen wurden einige Zeit im Wasserbade gehalten bei einer Temperatur, bei der die Gelatineschicht flüssig war. Dann wurden die Gläser noch 24 Stunden im Brutschrank gehalten und jede der Schichten analysiert. (Siehe nebenstehende Tabelle V.)

Wieder sieht man, daß die Konzentration an Salz in der Leimschicht bedeutend geringer ist, als dem Gehalt an Wasser entspricht (Spalte V), und zwar wird mit steigender Salzsättigung der relative Salzgehalt der Leimschicht, verglichen mit dem der zugehörigen Wasserschicht (Spalte VI), geringer, umgekehrt verhält sich der Leimgehalt der beiden Schichten, wie aus den Spalten VII und VIII hervorgeht.

Eine besondere Besprechung verdient noch der Salzgehalt (Spalte II). Um auch bei den niedrigeren Sättigungsgraden eine gute Entmischung zu erzielen, habe ich in den drei Reihen nicht ein gleiches Volumen hergestellt, sondern entsprechend der Abnahme der Salzkonzentration die Leimkonzentration erhöht, d. h. die 25 proz. und $33\frac{1}{3}$ proz. Sättigung in konzentrierteren Leimlösungen hervorgerufen. Da aber der Wassergehalt der Leimlösung (18 ccm enthielten 10 ccm H_2O) und der Salzlösung (100 ccm enthielten 77 ccm Wasser) bekannt ist, läßt sich der Einfluß der Konzentrationsänderung ungefähr berechnen. Da bei 14,62 ccm Wasser die Leimschicht 64,4 Proz. Wasser enthielt, müßte sie bei

Tabelle V.

I. Herstellung		II. Wasser Proz.	III. Sulfat Proz.	IV. Leim Proz.	V. Auf 100 g Wasser kommen g Salz	VI. Salzkonzentration in der Wasserschicht zur Salzkonzentration in der Leimschicht	VII. Auf 100 g Wasser kommen g Leim	VIII. Leimkonzentration in der Wasserschicht zur Leimkonzentration in der Leimschicht
18 ccm Leimlösung +	Wasserschicht	83,4	13,3	3,3	15,95	1,496	3,96	1
6 ccm Na_2SO_4-Lösung	Leimschicht	64,4	6,865	28,73	10,54	1	44,61	11,28
18 ccm Leimlösung +	Wasserschicht	81,2	17,95	0,85	22,11	1,883	1,05	1
9 ccm Na_2SO_4-Lösung	Leimschicht	51,4	6,00	42,86	11,74	1	83,81	80,06
18 ccm Leimlösung +	Wasserschicht	78,19	21,56	0,25	27,57	2,071	0,32	1
12 ccm Na_2SO_4-Lösung	Leimschicht	53,47	7,12	39,41	13,37	1	73,86	231

16,93 resp. 19,21 ccm Wasser: 74,58 resp. 84,75 Proz. Wasser enthalten, während nur 51,4 resp. 53,47 Proz. gefunden wurden, d. h. mit steigender Salzkonzentration wird die Leimschicht wasserärmer, während umgekehrt, wie Spalte VIII zeigt, die Wasserschicht leimärmer wird. Wir sehen also, wie die Verteilung der drei Stoffe mit der Variation der Konzentration sich ändert und eine wie geeignete und wirkungsvolle, daher auch zur Trennung brauchbare Prozedur die Salzfällung ist.

In dieser quantitativen Wirksamkeit unterscheidet sich scheinbar die Aussalzung von der Ausätherung: bei der letzteren, im Laboratorium so häufig ausgeübten Prozedur ist es eine immer wieder beobachtete Erscheinung, daß die Ausätherung niemals vollständig, niemals eine quantitative Trennung ist, auch wenn die Unterschiede der Löslichkeit in den beiden Lösungsmitteln sehr groß sind; für die Aussalzung nehmen wir aber, und, wie Spalte VIII der Tabelle V zeigt, mit Recht an, daß sie für praktische Zwecke nahezu quantitativ sein kann. — Das macht eine nähere Betrachtung des Verteilungssatzes nötig.

Bei der Ausschüttelung von Bernsteinsäure aus wässeriger Lösung mit Äther haben wir zwei unvollständige Lösungen vor uns, da sich natürlich ein Gemenge der drei Substanzen herstellen läßt, das eine vollständige Lösung darstellt. Wir dürfen nun schon bei der unvollständigen Lösung nur eines Stoffes in einem Lösungsmittel nicht bloß Lösung und ungelöst gebliebenen Stoff unterscheiden, sondern müssen berücksichtigen, daß auch der ungelöst gebliebene Stoff etwas von dem Lösungsmittel auflösen kann. Schütteln wir Phenol mit Wasser, so erhalten wir zwei Schichten, wenn wir mehr als 7 g Phenol pro 100 ccm Wasser nehmen, nämlich eine obere, wässerige Phenollösung, und eine untere, die entgegen der allgemeinen Ausdrucksweise nicht nur ungelöst gebliebenes Phenol, sondern eine Lösung von Wasser in Phenol ist. Wasser löst sich in Phenol so erheblich, daß Alexejeff die Kurven dafür geben konnte. Ebenso ergeben sich bei der Ausätherung der Bernsteinsäure aus wässeriger Lösung zwei Schichten, von denen die obere eine Lösung von Bernsteinsäure und Wasser in Äther, die untere eine von Äther und Bernsteinsäure in Wasser darstellt.

Am genauesten sind diese Verhältnisse von E. Duclaux*) untersucht worden, der Amylalkohol und Wasser durch Zusatz eben

*) Ann. chim.-phys. (5) 7, 267 (1876).

hinreichender Mengen von Äthylalkohol oder Essigsäure in Lösung brachte und dann durch Temperaturherabsetzung (sogenannte kritische Temperatur) wieder eine Entmischung hervorrief. Es ergab sich (mit Hilfe einer ingeniösen Anordnung der Analyse), daß das Lösungsmittel (Äthylalkohol oder Essigsäure) sich in beiden Schichten in gleicher Menge vorfand, und daß auch das Verhältnis zwischen Amylalkohol und Wasser bei allen Gemengen nahezu das gleiche war.

Verwickelter liegen die Verhältnisse, wenn der eine Stoff gegen den andern erheblich überwiegt: Setzen wir z. B. zu einer Lösung von Chloroform in Alkohol soviel Wasser, als sich eben löst, so erhalten wir eine Mischung, die, gleichgiltig, ob wir nun Wasser oder Chloroform zusetzen, die Abscheidung einer Schicht zeigt, die reicher an Wasser ist und als spezifisch leichter sich oben abscheidet. Das Verhältnis ist auch umkehrbar, denn wenn wir eine Lösung anwenden, die aus viel Wasser und wenig Chloroform besteht, so wird, gleichgiltig, ob wir Chloroform oder Wasser zufügen, eine spezifisch schwerere, d. h. chloroformreiche, Flüssigkeit zur Abscheidung kommen.

Übertragen wir diese Erfahrungen auf die Aussalzung der Kolloide, so müssen wir bedenken, daß die von uns angewandten gesättigten Salzlösungen immer sehr viel mehr Moleküle enthalten als die Kolloidlösungen, daher schon aus diesem Grunde das Wasser zum größeren Teil bei dem Salz zurückbleibt, d. h. die Eiweißschicht ist kleiner und wasserärmer.

Dazu kommt aber noch ein anderer Punkt: mischen wir zwei Flüssigkeiten miteinander, die sich teilweise lösen, so ist der Dampfdruck ihres Gemenges kleiner als die Summe der Dampfdrucke ihrer Bestandteile bei derselben Temperatur; setzen wir mit van't Hoff-Nernst statt Dampfdruck: „Lösungsdruck“, so wird uns eine Änderung der Löslichkeit in einem gemeinsamen Lösungsmittel eines Gemenges verständlich.

Können wir uns nun vorstellen, daß die Löslichkeit nur des einen Körpers herabgedrückt wird? Sind solche Verhältnisse bei der Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Lösungsmitteln bekannt?

Ich möchte hierfür zwei Fälle anführen: 1. Benzol und Wasser lösen einander sehr wenig, beide aber lösen sich in Essigsäure. Setzt man nun zu 100 ccm Benzol 50 ccm Essigsäure und nur 1,5 ccm Wasser, so erhält man (nach Duclaux) eine obere Schicht, die 42mal so groß ist als die untere, während der Gehalt der oberen Schicht an Essigsäure nur 31,2 gegen 68,6 der unteren ist.

Dem reiht sich ein Versuch von Hantzsch*) an. Die Löslichkeit des Dimethylaminchlorhydrats in 100 Chloroform (c_2) ist 26,9, in 100 Wasser (c_1) 208, das Verhältnis $c_1 : c_2$ also gleich 7,75; bei der Ausschüttelung aber einer wässerigen Lösung des Salzes mit Chloroform geht es nicht in dieses hinein, das Verhältnis $c_1 : c_2$ wird also gleich ∞. Setzen wir also zu einer Chloroformlösung des Salzes Wasser hinzu, so wird reines Chloroform abgeschieden.

Es ist danach verständlich, daß es Proteide gibt, die durch Aussalzen ganz abgeschieden werden. Aber es ist andererseits danach zu erwarten, daß dieses Verhalten nicht notwendig für alle Proteide gilt. In der Tat läßt sich bei den Albumosen beobachten, daß die einzelnen Fraktionen bei der zu ihrer Fällung nötigen Konzentration etwas, wenn auch nur wenig, löslich sind, was die Schwierigkeiten der Trennung derselben merklich erhöht.

Für die Verteilung ist also nicht allein die Löslichkeit maßgebend, sondern noch ein anderer Faktor, den wir als Lösungsintensität bezeichnen können. Wie bei den Elektrolyten nicht in der Größe der Ladung sich der Grad der Positivität oder Negativität zeigt, sondern in der Festigkeit, mit der diese Ladung gebunden wird, wie zur Spaltung von KF ein viel größerer elektrischer Zug notwendig ist als zu der von Ag J, obgleich beide die gleiche Menge Ladung (Elektronen) enthalten, so ist auch die Intensität, mit der sich der gelöste Stoff im Lösungsmittel verteilt, nicht der Löslichkeit gleich zu setzen. Die Intensität, mit der Wasser und Salz sich bindet, wird größer sein als die, mit der Wasser und Eiweiß sich bindet, und ebenso wird die Löslichkeit von Salz in Eiweiß je nach der Art des Eiweißes und des Salzes variieren.

Es ergibt sich daraus also, daß der Lösungsdruck nicht nur durch einen quantitativen Faktor ausgedrückt wird, wonach er stets einfach der Zahl der Moleküle und Ionen (dem osmotischen Druck) entspräche, sondern auch noch von einem qualitativen, spezifischen Faktor abhängt, der Lösungsintensität. Die verschiedenen Salze werden daher ein verschiedenes Fällungsvermögen haben, wie dies Hofmeister und Pauli ja schon festgestellt haben**). Die Differenzen zwischen den verschiedenen Salzen bezüglich ihrer wässerigen Lösungen sind qualitativer und quantitativer Natur. Daß die gut aussalzenden Stoffe (Na_2SO_4, $MgSO_4$) besser und größer kristallisieren als die anderen (NH_4Cl, KNO_3) und auch hervorragend ge-

*) Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte. **73** (Hamburg), II. 1. 150.

**) Auf die Fällung hemmende Wirkung der Anionen gehe ich nicht besonders ein, da es sich ja nur um ein anderes Vorzeichen handelt.

eignet sind, übersättigte Lösungen zu bilden, d. h. in Verbindung mit dem Lösungsmittel zu verbleiben (Ostwalds Lehrbuch I. 1039), ist ein der quantitativen Messung nicht zugänglicher Unterschied*).

Hierzu eignet sich besser die Löslichkeitszunahme der Salzlösungen mit steigender Temperatur. Nordenskjöld hat gezeigt, daß die Zunahme stets der schon vorhandenen Salzmenge umgekehrt proportional ist, d. h. je mehr gelöst ist, um so weniger löst sich noch, das Gelöste setzt weiterer Lösung um so stärkeren Widerstand entgegen. Die von Nordenskjöld**) gefundenen Zahlen entsprechen der Gleichung:

$$NH_4Cl: \log S = -0{,}5272 + 0{,}5483 \frac{t}{100} + 0{,}1732 \left(\frac{t}{100}\right)^2$$

$$KCl: \text{„} = -0{,}5345 + 0{,}379 \frac{t}{100} + 0{,}0900 \left(\frac{t}{100}\right)^2$$

$$NaCl: \text{„} = -0{,}4484 + 0{,}0105 \frac{t}{100} + 0{,}0319 \left(\frac{t}{100}\right)^2$$

Der Faktor für t und t^2 ist also bei $NH_4 > K > Na$, d. h. der Widerstand, den die vorhandene Salzmenge der Lösung neuer Mengen entgegensetzt, ist bei $Na > K > NH_4$, ersteres also ein besseres Fällungsmittel als K, dieses als NH_4. Schon eine Salzlösung verhält sich also gegen das Salz selbst nicht wie ein ideales Gas.

Betrachtet man die Reihenfolge der Salze, wie sie Hofmeister und Pauli festgestellt haben, so erkennt man zwei Gesetzmäßigkeiten. Zunächst daß mit der Zunahme der Valenz der Ionen das Aussalzungsvermögen zunimmt. Das hat Schulze schon vor Jahren festgestellt, während umgekehrt die hemmende Wirkung der mehrwertigen Anionen (nur das Fluor macht eine Ausnahme) kleiner ist. Bei der Esterspaltung***) durch Säuren wirken von zugefügten homologen Neutralsalzen die mit $Br > NO_3 > Cl > SO_4$, bei der durch Alkalien wirken $SO_4 > Cl > NO_3 > Br$; im ersteren Falle wirkt Sulfatzusatz hemmend, im zweiten beschleunigend, während die einwertigen Anionen umgekehrt wirken.

Übersichtlicher ist die andere Gesetzmäßigkeit, daß die Fällungstendenz der Ionen mit abnehmendem Atomgewicht zunimmt: $Li > K > Na$, und bezüglich der Hemmung: $J > Br > Cl$.

Vielleicht ergibt sich eine gemeinsame Auffassung dieser Verhältnisse aus der Betrachtung der inneren Reibung†). Die Reihenfolge ist da $SO_4 > Cl > NO_3 > ClO_3 > Br > J$ und $Na > K > NH_4$.

---

*) Erstere zeigen bei niederer Temperatur eine höhere Ausflußgeschwindigkeit als Wasser, letztere immer eine höhere. (Innere Reibung.)

) Poggendorffs Annalen **136, 309.

***) Arrhenius, Zeitschrift f. physik. Chemie **4**, 226; **28**, 327.

†) A. Sprung, Poggendorffs Annalen **159**, 1. — Slosse, Wiedemanns Annalen **14**, 13. — J. Wagner, ebenda **18**, 259. Zeitschrift f. physik. Chemie **5**, 31.

Dieselbe ist für drei homologe Salzpaare

	K	Na	Li
SO_4	1,090	1,221	1,291
Cl	0,967	1,099	1,130
NO_3	0,956	1,052	—

Gerade die innere Reibung der Flüssigkeiten bedingt ja ihre Abweichung von den Gasgesetzen, und daher ist es auch verständlich, daß hier entsprechend der inneren Reibung die Giltigkeit der Lösungs- und Dissoziationsgesetze eine genau entsprechende Einschränkung bei homologen Salzlösungen erfährt.

Ebenso fanden W. C. Röntgen und Schneider*) für die Kompressibilität eine ähnliche Reihenfolge: J, NO_3, Br, Cl, SO_4, auch für die Molekularvolumen:

	NH_4	K	Li	Na
J	1,048	1,041	1,025	1,023
NO_3	1,043	1,032	1,016	1,017
Br	1,038	1,025	1,011	1,010
Cl	1,028	1,016	1,001	1,001

und ebenso für die Oberflächenspannung. Wir haben also in der Hofmeister-Paulischen Reihenfolge dieselbe, die sich bei allen solchen Eigenschaften der Salzlösungen wiederfindet, die von den additiven Eigenschaften der Ionen abhängig sind.

Eine weitere Begrenzung des Verteilungssatzes hat in jüngster Zeit Hantzsch kennen gelehrt.

In Gemeinschaft mit A. Vagt zeigte er**), daß der Verteilungskoeffizient abhängig ist von der Temperatur, wenn sich Amin, Brom, Jod oder CO_2 zwischen Wasser oder einer Verbindung vom Wassertypus (Glyzerin oder Äther) einerseits (c_1) und einem Kohlenwasserstoff, etwa Toluol oder Chloroform andererseits (c_2) verteilt. Der Faktor K (c_1/c_2) wird in einer hyperbelähnlichen Kurve von 0° bis 100° kleiner***), die genannten Stoffe haben also zu Wasser bei niederer Temperatur eine erhöhte „Lösungstendenz“, Bildung von „Hydraten nach unbestimmten Verhältnissen“. Umgekehrt zeigen bei der Verteilung zwischen Wasser und Äther eine Zunahme von K mit steigender Temperatur die Rhodanide, die ja auch in Paulis Reihe die stärkste Hemmungswirkung zeigen.

*) Wiedemanns Annalen **29**, 105.

) Zeitschrift f. physik. Chemie **38, 705.

***) Sehr charakteristisch für diese Abhängigkeit der Verteilung von der Temperatur ist das Verhalten der Jodstärke.

Für sie nimmt Hantzsch eine Verbindung mit Äther an; vielleicht kann man eine ähnliche Annahme für die Hemmungswirkung der Anionen machen; Spring und Lucion*) fanden, daß das Hydrogel von CuO mehr KBr als KCl und mehr KJ als KBr zerlegt und die entsprechenden Säuren (Anionen) absorbiert.

Auch die Salzfällung der Eiweißkörper ist nach meinen Erfahrungen von der Temperatur abhängig. Kristallisiertes Serumalbumin beginnt bei Zimmertemperatur bei 57 Proz. Ammonsulfat-Sättigung zu fallen, bei 40° C. aber schon bei 49 Proz.

Hantzsch hat aber auch eine Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von der Konzentration gefunden: bei zunehmender Verdünnung wächst der im Wasser (oder einem Lösungsmittel vom Wassertypus) bleibende Anteil von Jod oder Aminen. So steigt im System Glyzerin ⟷ Jod ⟷ Chloroform der Faktor K von 0,362 bis auf 0,562, was also ganz dem Verhalten des Systems Wasser ⟷ Salz ⟷ Kolloid entspricht.

Daß die Fällungsgrenzen eines Eiweißkörpers von der Konzentration seiner Lösung abhängen, darauf ist schon oben hingewiesen worden.

Wir kommen somit zu einem zusammenfassenden Überblick über alle bisher bei der Aussalzung der Eiweißkörper gefundenen Tatsachen, wenn wir uns vor Augen halten, daß die Aussalzung nicht einfach proportional der „Entziehung des Lösungsmittels“ ist, sondern (innerhalb gewisser Grenzen) unabhängig von der Konzentration verläuft. Die „Wasserentziehung“ erscheint als eine Teilerscheinung der Entmischung. Neue Belege hierfür habe ich am kolloidalen Eisenoxyd in einigen neuen Versuchsreihen gefunden, welche am Schlusse folgen. Wenn wir annehmen, daß zwischen Eiweiß und Salzen eine gewisse Verbindung bestehen kann (gegenseitige Lösung), so sprechen hierfür folgende Erfahrungen:

Wie die Aminosäuren ist das Eiweiß ein Zwitterion**), das nicht nur mit Säuren und Basen Salze bildet***), sondern auch mit Salzen sich verbindet; ja für die Aminosäuren haben Bredig und Winkelblech†) wahrscheinlich gemacht, daß sie auch mit Wasser

---

*) Nach Bemmelen.

) Hardy nimmt an, daß die Fällung der Kolloide auf dem Verschwinden einer Potentialdifferenz, Entstehen von Isoelektrizität beruht. Vgl. dagegen J. Friedländer, Zeitschrift f. physik. Chemie **38, 385 und H. Freundlich, ebenda **44**, 129.

***) Spiro und Pemsel, Zeitschrift f. physiol. Chemie **26**, 233.

†) Zeitschrift f. physik. Chemie **36**, Heft 5.

nicht dissoziierte Salze bilden, so daß wir gewissermaßen das Hydrat des Eiweißes (siehe Hantzsch) in Lösung hätten. Daß die Lösungen von Kolloiden Salze aus wässeriger Lösung aufnehmen, hat in neuester Zeit hauptsächlich Bemmelen*), für die Eiweißstoffe speziell Pauli nachgewiesen. Da also das Eiweiß als Lösungsmittel für Salze fungieren kann, so haben wir, da Eiweiß als fester Körper und Wasser nicht unter allen Verhältnissen mischbar sind, ein Verteilungssystem Wasser — Salz — Eiweiß, aus dem sich alle bisher beobachteten Tatsachen einwandsfrei erklären.

Leider haben sich, wenn wir von einigen Anwendungen des periodischen Systems absehen, für Art und Grad der Löslichkeit der meisten Stoffe noch gar keine Gesetzmäßigkeiten zeigen lassen, wir vermissen sie daher auch auf dem Gebiete der Aussalzung. Nur der negative Schluß läßt sich daraus ziehen, daß — wenn auch die Aussalzbarkeit im allgemeinen nur großen Molekülen zukommt — die mehr oder weniger leichte Aussalzbarkeit nichts über die Molekulargröße aussagt, daß die Globuline z. B. nicht ein größeres Molekül zu haben brauchen als die Albumine; das wird ja schon bewiesen durch die Abspaltung leichter fällbarer Albumosen aus den schwer fällbaren Albuminen bei der peptischen Verdauung.

II.
Über die Einwirkung der Alkohole auf die Eiweißkoagulation.

Wenn auch der Alkohol teils für sich allein, teils als Hilfsmittel bei der Wärmekoagulation allgemein zur Ausfällung der Eiweißkörper benutzt wird, so liegen hierüber doch nur spärliche methodische Untersuchungen vor. Pohl**) erwähnt, „daß man die Konzentration von Methyl- und Äthylalkohol auf etwa 20 Proz. steigern muß, um Eiweißfällung zu erzielen“. Im Anschluß an frühere Untersuchungen***) und mit der damals mitgeteilten Methodik habe ich hierüber einige Versuche angestellt, über die ich in aller Kürze berichten will:

1. Die einwertigen Alkohole der Fettreihe.

a) Sie setzen entsprechend der zugefügten Menge den Koagulationspunkt der Eiweißkörper herab. So sank der Koagulationspunkt des Serumeiweiß von 62,8° bei stets wiederholtem Zusatz

*) Zeitschrift f. anorgan. Chemie **23**, 321 bis 372.
) Archiv f. experim. Path. u. Pharm. **21, 284.
***) Spiro, Zeitschrift f. physiol. Chemie **30**, 182.

von 2 Vol.-Proz. Methylalkohol auf 62,5° — 61,5° — 58,25° — 54,0° — 51,9° — 50,9° — 46,8° — 45,5°. Wie die Alkohole der Fettreihe verhält sich auch das Aceton.

b) Zur Erzielung einer Eiweißfällung bedarf es bei den niedrigen Alkoholen einer größeren Konzentration als bei den höheren; bei Methylalkohol 17 bis 20 Proz., Äthylalkohol 16 bis 18 Proz., Propylalkohol 11 bis 13 Proz., Butylalkohol 4 bis 6 Proz., Amylalkohol 2 bis 4 Proz. Der Isopropylalkohol ist viel weniger wirksam als der normale, da er erst bei 20 bis 24 Proz. Sättigung fällt, ebenso ist der Isobutylalkohol weniger wirksam als sein normaler Isomerer.

2. Die mehrwertigen Alkohole der Fettreihe, z. B. Glyzerin, Mannit, Traubenzucker, Milchzucker (auch Dextrin, selbst Wittepepton), wirken koagulationshemmend.

a) Bei zunehmendem Gehalt an dem Alkohol steigt der Koagulationspunkt, z. B. bei steigendem Gehalt an Mannit (1 ccm, 2 ccm bis 9 ccm einer 15proz. Mannitlösung mit 1 ccm Eiweißlösung, aufgefüllt mit Wasser auf 10 ccm), von 60,8 auf 61,6 — 62,0 — 62,4 — 62,7 — 63,2 — 63,7 — 64,4 — 65,0, ebenso bei steigendem Glykosegehalt (75proz. Lösung) von 58,9° auf 61,4 — 65,3 — 69,1 — 74,8 — 78,9 — 81,2 — 83,1 — 84,4 — 85,6. Noch stärker wirken Milchzucker und Galaktose.

b) Mit steigendem Gehalt an den mehrwertigen Alkoholen wird die Hitzekoagulation der Eiweißlösungen unvollständiger. Davon kann man sich nicht nur an der zunehmenden Stärke der Biuretreaktion im Koagulationsfiltrat überzeugen, man kann auch durch Sättigung einer nativen Eiweißlösung mit Milchzucker ihre Koagulationsfähigkeit ganz aufheben.

Ähnlich wie die Alkohole wirken auch Ester und Ketone. Die Koagulationshemmung tritt nur ein bei neutraler bzw. schwach alkalischer oder schwach saurer Reaktion, starke Säuren hindern sie. Für die Aldehyde liegen schon ähnliche ausführliche Beobachtungen von F. Blum*) und Leo Schwarz**) vor. Doch mag es dahingestellt bleiben, inwieweit die Wirkung der Aldehyde auf einer chemischen Reaktion beruht. Eine Milchzucker-Eiweißlösung, die 100 Stunden gegen fließendes Wasser diffundiert hatte, koagulierte nicht vollständig beim Erhitzen.

3. Von den aromatischen Alkoholen ist es für das Phenol längst bekannt, daß es Eiweiß fällt. Bei einem Gehalt

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie **22**, 127.

) Zeitschrift f. physiol. Chemie **31, 460.

an Phenol von 0,6 Proz. tritt schon Trübung, bei 1,0 bis 1,2 Proz. Fällung und bei 1,8 Proz. dicker Niederschlag auf, doch ist die Fällung auch bei einem Überschuß an Phenol immer unvollständig. Bei den höheren aromatischen Alkoholen tritt die Fällung viel langsamer und später ein: bei Brenzkatechin tritt z. B. eine deutliche Trübung erst bei einem Gehalt von 2 Proz., beim Resorzin erst bei 3 Proz., bei Pyrogallol erst bei 5 Proz. ein. — Wird der Gehalt an diesen Alkoholen gesteigert, so zeigt sich eine sehr eigentümliche Erscheinung. Setzt man zu einer Eiweißlösung Resorzin bis zu einem Gehalt von 5 Proz., so erhält man eine starke Fällung. Die Fällung ist unvollständig, nimmt aber bei einem höheren Gehalt an Resorzin nicht erheblich zu, ja bei 30, 35 und 40 Proz. wird sie geringer, und bei 45 Proz. tritt überhaupt kein Niederschlag mehr auf. Solche Mischungen, die bei einem Gehalt von 20 bis 40 Proz. Resorzin getrübt sind, lösen sich nun klar in der Hitze auf, beim Abkühlen fällt aber wieder ein Niederschlag aus. Wir haben also hier Löslichkeitsverhältnisse, die denen des Bence-Jonesschen Eiweißkörpers ganz ähnlich sind. Am nächsten liegt es hier, das Entstehen einer Resorzin- (resp. Hydrochinon-, Pyrogallol-) Eiweißverbindung anzunehmen; hierfür spricht, daß sich aus den Resorzin-Eiweißlösungen durch Aethylalkohol ein Niederschlag gewinnen läßt, der auch nach gutem Auswaschen noch bei ganz gelindem Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure schöne Reaktion nach Molisch gibt. Beim Kochen mit Wasser wird aber aus der Verbindung Resorzin wieder abgespalten, ähnlich wie dies auch von den Formaldehyd-Eiweißverbindungen bekannt ist.

III.

Die Einwirkung alkoholischer Salzlösungen auf die Eiweißkoagulation.

Gelegentlich einer Versuchsreihe über die Fraktionierung mit Kaliumazetat*) habe ich die Beobachtung gemacht, daß eine Lösung von Serumeiweißstoffen, die 50 Proz. Kaliumazetat enthielt, nach dem Versetzen mit dem doppelten Volumen 95proz. Alkohols auf dem Wasserbade gekocht werden konnte, ohne Fällung, ja ohne eine Trübung zu zeigen. Das Eiweiß erleidet dabei keine tiefgreifende Veränderung, denn die erhaltene (event. filtrierte) Lösung zeigt nach starkem Verdünnen wieder die Eigenschaften des ursprünglichen Eiweißes. Auch um Albuminatbildung

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie 31, 132. Vgl. auch diese Beiträge 3.

kann es sich nicht handeln, da die Albuminate in Alkohol schwer löslich sind.

Ähnlich wie das Kaliumazetat wirken vielfach Salze, die in Alkohol löslich sind, z. B. Chlorkalzium, Chlormagnesium, Chlorzink, Sublimat, Quecksilberazetat und Rhodankalium. — An Stelle des Äthylalkohols, kann man auch andere Alkohole anwenden, z. B. Methylalkohol oder Isopropylalkohol; höhere Alkohole, z. B. Amylalkohol, eignen sich schlecht, aromatische Alkohole noch schlechter.

Endlich können statt der echten Eiweißkörper auch andere Körper angewandt werden, so wird z. B. auch die Fällbarkeit der Heteroalbumose durch Alkohol infolge anwesenden Kaliumazetats verzögert oder aufgehoben.

Für die Deutung dieser Befunde, die einstweilen nur für analytische Zwecke von einer bestimmten Wichtigkeit sind, kann man natürlich ebenso gut eine Anlagerung des Salzes wie eine solche des Alkohols an die Eiweißstoffe vermuten: für beide Vorstellungen lassen sich leicht Analogieen anführen, zumal das Eiweiß wie andere Kolloide eine ganz besondere Fähigkeit hat, die verschiedensten Moleküle an sich anzulagern.

Daß Kaliumazetat die Anlagerung von Alkohol begünstigt, zeigt folgender Versuch: Das bei der Kondensation von Hippursäure und Benzaldehyd entstehende Lakton*)

$$\begin{array}{l} C_6H_5.C = N \\ \quad\quad\;\; | \quad\; | \\ \quad\quad\;\; O \quad C = NH.C_6H_3 \\ \quad\quad\quad \diagdown \diagup \\ \quad\quad\quad\; CO \end{array}$$

geht schon beim Stehen mit alkoholischem Kaliumazetat oder alkoholischem Kali unter Alkoholaufnahme in den Äthylester der Benzoylamidozimtsäure

$$\begin{array}{l} C_6H_5.CO.NH.C = C.H.C_6H_5 \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\; | \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad COOC_2H_5 \end{array}$$

über, obgleich das Lakton gegen Alkohol selbst ganz beständig ist, die Esterbildung aus der Säure auch nur schwierig vor sich geht. In diesem Fall begünstigt also das zugesetzte alkalische Salz die Esterbildung, die wir sonst in saurer Lösung vorzunehmen pflegen. — Natürlich kann dieser Versuch nicht zur „Erklärung" der am Eiweiß beobachteten Erscheinungen dienen, da es sich bei diesem, wie oben gezeigt, nur um eine durch Wasserzusatz aufhebbare Löslichkeitsänderung, nicht um chemische Umsetzungen handelt.

*) Erlenmeyer, Ann. d. Chemie **271**, 37. — Berliner Berichte **33**, 2, 2036. — Vgl. Spiro, Zeitschrift f. physiol. Chemie **28**, 174.

IV.

Über die Einwirkung von Alkohol und alkoholischen Salzlösungen auf kolloidales Eisenoxyd.

Da, wie oben schon hervorgehoben, einige Autoren die Salzfällung der Kolloide prinzipiell von der Alkoholfällung abtrennen, seien noch einige Versuche über die Einwirkung von Alkoholen auf kolloidales Eisenoxyd mitgeteilt, zumal im allgemeinen behauptet wird, daß es nur durch Salze, nicht durch Alkohol gefällt wird. Methyl- und Äthylalkohol fällen in der Tat nicht, wohl aber Propylalkohol. Von der käuflichen Lösung des Oxyds wurde 1 ccm durch 2 ccm Propylalkohol gefällt; verdünntere Lösungen brauchen erheblich mehr, z. B. eine Mischung von 0,5 ccm des Oxyds und 0,5 ccm Wasser schon 4,2 ccm Propylalkohol.

Amylalkohol fällt das kolloidale Eisenoxyd aus seiner Lösung nicht aus; der Grund dafür ist offenbar, daß die Löslichkeit des Amylalkohols in Wasser zu gering ist, so daß die zur Fällung nötige Konzentration nicht erreicht wird. Davon kann man sich leicht durch den Kunstgriff überzeugen, daß man Methylalkohol zusetzt: Fügt man z. B. zu 1 ccm der Oxydlösung 2 ccm Methylalkohol, so entsteht durch 3,5 ccm Amylalkohol eine Fällung, die im Überschuß von Methylalkohol löslich ist.

Um die Fällungsgrenze bei verschiedenen Konzentrationen vergleichen zu können, wurde als „Endpunkt“ derjenige Gehalt bezeichnet, wo die Flüssigkeit, von unten gesehen, im durchfallenden Licht undurchsichtig wird. Bei einiger Übung erkennt man den Punkt scharf genug, um vergleichende Bestimmungen ausführen zu können.

Tabelle VI.

	Oxydlösung ccm	Methylalkohol ccm	Wasser ccm	Wird gefällt durch Amylalkohol ccm
1.	1	+ 1	—	1,1
2.	1	+ 1,5	—	1,85—1,90
3.	1	+ 2,0	—	2,9—3,0
4.	1	+ 2,5	—	4,1—4,2
5.	1	+ 3,0	—	17
6.	1	+ 1	+ 1,5	Entmischung
7.	1	+ 1,5	+ 1,0	1,5
8.	1	+ 2,0	+ 0,5	2,65
9.	2	+ 2	—	2,2
10.	2	+ 1,5	—	1,3

Die Versuche zeigen von neuem (Versuch 10 gegen Versuch 7), daß die (untere) Fällungsgrenze um so tiefer liegt, je konzentrierter die Kolloidlösung ist. Sie zeigen ferner, daß die Ausfällung der Kolloide nicht einfach als Lösungsmittel-Entziehung, etwa nach Art der Verdampfung, zu deuten ist. Lösungsmittel für kolloidales Eisenoxyd ist nur Wasser, nicht Methylalkohol, der ausgefälltes oder im Vakuum eingetrocknetes kolloidales Eisenoxyd nicht löst, (siehe später); ein noch so großer Überschuß von Amylalkohol bringt aber kolloidales Eisenoxyd aus wässeriger Lösung nicht zur Fällung, weil seine Löslichkeit in Wasser nicht die Herstellung der wirksamen Konzentration gestattet. Eine solche wird aber bei Gegenwart von Methylalkohol erreicht. In den Proben aber, wo der Oxyd- und der Alkoholgehalt gleichbleibt, die Wassermengen aber wechseln (Versuche 7 und 9, ferner 8 und 3), wird dort weniger Amylalkohol zur Fällung gebraucht, wo die größeren Quantitäten Wasser vorhanden sind.

Alle diese Erscheinungen lassen sich aber leicht erklären resp. direkt ableiten aus der Annahme, daß zwei Lösungsmittel vorhanden sind, Kolloid und Wasser (bzw. methylalkoholisches Wasser), zwischen denen sich der Amylalkohol verteilt.

Als Fällungsmittel für kolloidales Eisenoxyd können auch Salze dienen. Da es darauf ankam, event. die Salzwirkung mit der Alkoholwirkung zu kombinieren, wurde als Salz Chlorkalzium in wässeriger Lösung angewandt. Als untere Fällungsgrenze wurde, wie oben, beginnende Undurchsichtigkeit im durchfallenden Licht angesehen.

Tabelle VII.

	Eisenoxydlösung ccm	Wasser ccm	Methylalkohol ccm	Untere Fällungsgrenze $CaCl_2$ ccm	Untere Fällungsgrenze auf 10 ccm berechnet
1.	1	1	—	1,6	4,4
2.	1	—	1	1,15	3,65
3.	1	2	—	2,8	4,8
4.	1	—	2	1,65	3,55
5.	2	—	—	1,2	3,74
6.	1	3	—	4,45	5,28
7.	1	—	3	2,25	3,6
8.	1	4	—	5,6	5,3
9.	1	—	4	2,8	3,59
10.	3	—	—	1,65	3,55
11.	4	—	—	2,2	3,55
12.	1	—	—	0,6	3,75

Andere Reihe (etwas konzentriertere $CaCl_2$-Lösung):

Tabelle VIII.

	Eisenoxydlösung ccm	Wasser ccm	Methylalkohol ccm	Untere Fällungsgrenze $CaCl_2$ ccm	Untere Fällungsgrenze auf 10 ccm berechnet
1.	2	—	—	0,90—0,95	3,1
2.	1	—	1	0,90—0,95	3,1
3.	3	—	—	1,25	3,0
4.	1	—	2	1,25	3,0
5.	4	—	—	1,75	3,0
6.	1	—	3	1,75	3,0
7.	2	—	2	1,70	3,0
8.	3	—	1	1,65—1,80	3,0
9.	1	3	—	3,20	4,4
10.	2	2	—	2,55—2,6	3,9
11.	3	1	—	2,0—2,1	3,4

Aus diesen Versuchen geht hervor:

Die untere Fällungsgrenze für wässerige Chlorkalziumlösungen ist eine konstante Größe bei gleichbleibender Konzentration. Verdünnt man die Kolloidlösung mit Wasser, so steigt die untere Fällungsgrenze, wie wir dies ja auch von den Eiweißlösungen wissen und mit dem Verteilungssatz erklären können.

Verdünnen wir aber die Eisenoxydlösung mit Methylalkohol, so steigt zwar die zur Fällung nötige absolute Salzmenge, die Fällungsgrenze bleibt aber genau dieselbe. Das Chlorkalzium verteilt sich also in Methylalkohol wie in Wasser, das kolloidale Eisenoxyd aber nicht; wir haben ja auch oben schon gesehen, daß Methylalkohol kein Lösungsmittel für kolloidales Eisenoxyd ist.

Jedenfalls sind die Versuche nur durch die Annahme von Lösungsvorgängen zu erklären. Eine Versuchsreihe mit käuflichem Glyzerin sei zum Vergleich angeführt.

Eisenoxydlösung	Zusatz	$CaCl_2$-Zusatz ccm	Fällungsgrenze
2 ccm	—	0,7 bis 0,75	2,6
1 „	1 ccm Glyzerin	1,1	3,5
1 „	1 „ Wasser	1,1	3,5
1 „	1 „ Methylalkohol	0,7 bis 0,75	2,6

Verdünnung mit Glyzerin wirkt also wie solche mit Wasser. Dem entspricht auch, daß das abzentrifugierte Oxyd sich in Glyzerin wie in Wasser löst.

XXVII.

Über einige Derivate des Taurins und die Synthese der Taurocholsäure.

Von Dr. **Siegfried Tauber** (Wien).

Aus dem physiologisch-chemischen Institute zu Straßburg.

Von den im Tierkörper als Endprodukt der Eiweißspaltung auftretenden Substanzen gelangen Glykokoll und Taurin in der Galle in Form von Glyko- und Taurocholsäure zur Ausscheidung. Soweit darüber Äußerungen in der Literatur vorliegen, stellt man sich vor, daß diese „gepaarten Gallensäuren" eine säureamidähnliche, der Hippursäure analoge Konstitution besitzen. Diese Annahme liegt, soweit es sich um die Glykocholsäure handelt, äußerst nahe. In der Tat kann man sich sehr gut vorstellen, daß in der Leber in ähnlicher Weise Glykokoll mit Cholsäure unter Wasseraustritt zusammentritt, wie dies für die Niere in betreff der Hippursäure seit den Richtung gebenden Versuchen von Bunge und Schmiedeberg bekannt ist. Die Spaltbarkeit der Glykocholsäure in ihre Komponenten bietet mit jener der Hippursäure völlige Analogie, ebenso die Überführbarkeit in eine der Benzoylglykolsäure entsprechende Cholylglykolsäure.

Die Vorstellung, daß die Bildung der Glykocholsäure einer Acylierung, der Anlagerung des Cholsäurerestes an den Stickstoff des Glykokolls entspricht, hat um so weniger Befremdendes, als das Glykokoll auch sonst der Anlagerung saurer Gruppen, z. B. der Acetyl- und Benzoylgruppe, leicht zugänglich ist*).

Nicht so einfach liegen die Verhältnisse für die Bildung der Taurocholsäure. Dem Taurin geht die säurebindende Valenz, welche den Aminofettsäuren ihren amphoteren Charakter verleiht, ganz oder nahezu ganz ab. Es bildet keine Salze mit Säuren, und von Azylderivaten ist nur die noch zu erwähnende Phtalimidis-

*) Es darf nicht verschwiegen werden, daß diese Analogie noch keinen endgültigen Beweis für die Richtigkeit der entwickelten Vorstellung abgibt. Der Vorgang könnte sich im Tierkörper auch verwickelter gestalten, z. B. wenn die Cholsäure sich ebenso mit anderen α-Aminofettsäuren verbände (z. B. Leucin) und erst aus dem Produkt durch Abbau Glykocholsäure entstände.

äthionsäure*) bekannt. Es hat demnach die Vorstellung, daß im Tierkörper Cholsäure und Taurin nach Art eines Säureamids zu Taurocholsäure zusammentreten, von chemischen Gesichtspunkten aus manches gegen sich, zumal da auf Grund der Beobachtungen von E. Friedmann an die Möglichkeit zu denken ist, daß die Cholsäure sich im Tierkörper zunächst mit dem Cysteïn, welches noch ganz den Charakter der Monaminosäuren darbietet, verbinden und daß erst aus einer so entstandenen Cysteïnocholsäure durch Oxydation Taurocholsäure hervorgehen könnte.

Demgegenüber ist allerdings zu beachten, daß das Taurin im Tierkörper unter Umständen eine der Amidbildung nahestehende Synthese durchmacht — die Überführung in Taurokarbaminsäure**), welche bei einer anderen Aminofettsäure, die im Organismus schwierig verbrannt wird, in der Umwandlung von Tyrosin zu Tyrosinhydantoin***) ihr Seitenstück findet.

Ich habe mich in den nun zu schildernden Versuchen zunächst bemüht, Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, inwiefern die bei den Monaminosäuren erfolgreichen Anlagerungsmethoden auch beim Taurin brauchbar sind. Über das Ergebnis kann ich um so kürzer berichten, als es vielfach negativ war.

Darstellung des Ausgangsmaterials.

Zur Gewinnung von einem Gramm reinen Taurins muß man ungefähr 1½ Liter Rindergalle verarbeiten. Die Darstellung des Taurins wurde nach bekannten Methoden vorgenommen. Am raschesten führte folgendes Verfahren zum Ziele.

Fünf Teile Rindergalle werden mit einem Teil konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 mehrere Stunden lang gekocht, bis die sich als schwarze, harzige Massen ausscheidenden Dyslysine beim Ausziehen in Fäden spröde werden und die klar gewordene Flüssigkeit nicht mehr die Pettenkofersche Reaktion gibt. Man läßt erkalten, gießt von den Dyslysinen ab, engt stark ein, filtriert die noch warme Flüssigkeit von dem auskristallisierten Kochsalz ab, dampft das dunkelbraune Filtrat mit Tierkohle auf ein kleines Volumen ein und befreit mittelst Durchleiten von Wasserdampf möglichst von Salzsäure. Das Filtrat wird — eventuell nach Behandlung mit Bleikarbonat und Entfernung des Chlorbleis — zur Trockene eingedampft, das salzsaure Glykokoll mit 5 Proz. Salzsäure haltendem Alkohol (nicht mit Alkohol allein!) extrahiert, aus der Lösung des Rückstandes in 5proz. Salzsäure das Taurin mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols in weißen Kristallen gefällt und durch Umkristallisieren aus heißem Wasser, eventuell unter Zusatz von etwas absolutem Alkohol, gereinigt.

---

*) Pellizzari und Matteucci, Liebigs Annalen, **248**, 152 (1888).
) Salkowski, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **6 (1873).
***) Blendermann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **6**, 253 (1882).

Taurin und Benzoesäureanhydrid.

Fein gepulvertes Taurin wurde in überschüssiges erhitztes Benzoesäureanhydrid eingetragen und im Ölbade auf 250° durch eine Stunde erhitzt, wobei die Flüssigkeit sich stark bräunte. Ein geringer Teil des Taurins blieb hierbei ungelöst. Aus der beim Erkalten erstarrenden Masse wurde das überschüssige Benzoesäureanhydrid mit Petroläther extrahiert, der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen, filtriert, mit Tierkohle gereinigt und verdunsten gelassen. Der kristallinische, gelblich braune Rückstand wurde mit ammoniakalischem Wasser aufgenommen, wobei eine geringe Menge einer braunen, öligen Flüssigkeit zurückblieb. Beim Verdunsten der Lösung blieb ein kristallinischer Rückstand, der in absoluten Alkohol überging und aus der alkoholischen Lösung mit Aceton leicht gefällt werden konnte. Die Kristalle wurden durch wiederholtes Umfällen und Waschen mit Aceton gereinigt.

Kleine, glänzende, leicht gelblich gefärbte, schüppchenförmige Kristalle, in Alkohol, Äther und heißem Petroläther löslich, in Wasser und in heißem Aceton schlecht löslich, sauer reagierend und bei 175° schmelzend. Sie gaben, bei 110° durch drei Stunden getrocknet, kein Kristallwasser ab.

0,1774 Substanz: 0,3812 CO_2 und 0,1029 H_2O = 58,59 Proz. C und 6,49 Proz. H.

0,1460 Substanz: bei 17,5° und 767 mm B 11,58 ccm N = 9,29 Proz.

0,1879 Substanz: 0,2841 $BaSO_4$ = 20,77 Proz. S.

Das entspricht einer Zusammensetzung $C_{15}H_{20}N_2S_2O$:

	Berechnet	Gefunden
C	58,38	58,59
H	6,53	6,49
N	9,10	9,29
S	20,80	20,77
O	5,19	—

Wie aus der Zusammensetzung hervorgeht, war es nicht zu der nach Analogie der Bildung von Hippursäure unter gleichen Umständen*) erwarteten Bildung des Benzoyltaurins gekommen, sondern es hatte eine Abspaltung von Kohlenstoff, anscheinend in Form von Kohlendioxyd, stattgefunden.

Der gefundenen Zusammensetzung nach könnte sich die verwickelte Reaktion in folgendem Sinne abspielen: $C_{14}H_{10}O_3 + 2C_2H_7NSO_3 = C_{15}H_{20}N_2S_2O + 3CO_2 + 2H_2O$.

Taurin und Phtalsäureanhydrid.

Ebenso verwickelt gestaltete sich die Einwirkung von Phtalsäureanhydrid.

Fein gepulvertes Taurin wurde im Ölbade bei 250° mit überschüssigem Phtalsäureanhydrid durch zwei Stunden geschmolzen. Ent-

*) Curtius, Berichte d. deutsch. chem. Ges. 17, 1663 (1884).

gegen der Angabe von Drechsel*), Taurin löse sich nicht in siedendem Phtalsäureanhydrid, erhielt ich hierbei unter starkem Schäumen eine klare, leicht gelbliche Flüssigkeit, die beim Erkalten kristallinisch erstarrte. Die Substanz wurde durch mehrstündiges Ausziehen mit Äther im Soxhletschen Extraktionsapparate von dem Überschuß an Phtalsäureanhydrid befreit.

Das erhaltene Produkt ist in Wasser sehr leicht, schlecht in Aceton löslich, fällt aus der konzentrierten, wässerigen Lösung beim Versetzen mit Aceton sofort aus, löst sich aber wieder im Überschuß von Aceton. Aus kaltem und heißem Wasser, viel schöner aber aus Aceton, kristallisiert es beim Verdunsten in zentimetergroßen, wasserhellen, regulär-hexagonalen, sehr dünnen, biegsamen, glimmerähnlichen Tafeln, die nur bei verlangsamter Verdunstung des Acetons eine ziemliche Dicke erreichen.

Beim Übergießen mit Aceton zerfallen die trockenen Kristalle zunächst in Nadeln, was sich unter dem Mikroskope schön verfolgen läßt.

Der Schmelzpunkt liegt scharf bei 50°. Die lufttrockenen Kristalle geben im Vakuum über Schwefelsäure Kristallwasser ab.

Präparat I.

0,4454 Substanz verloren im Vakuum über Schwefelsäure nach 22 h 0,0682 H_2O = 15,31 Proz.

0,2002 Substanz: 0,3199 CO_2 und 0,0779 H_2O = 43,58 Proz. C und 4,35 Proz. H.

0,1521 Substanz: bei 19,5° und 763 mm B 792 ccm N = 6,01 Proz. N.

Präparat II.

0,6311 Substanz verloren im Vakuum über Schwefelsäure nach 22 Stunden 0,0935 = 14,81 Proz. H_2O.

0,1836 Substanz: 0,2903 CO_2 und 0,0714 H_2O = 43,11 Proz. C und 4,35 Proz. H.

0,2418 Substanz: 0,1601 $BaSO_4$ = 9,09 Proz. S.

Diese Zahlen stimmen am besten zu der Formel

$$C_{25}H_{29}N_3S_2O_{16} + 7\,H_2O.$$

	Berechnet:	Gefunden: I.	II.
$7\,H_2O$	15,43	15,31	14,81

Für die wasserfreie Substanz:

	Berechnet	Gefunden I	Gefunden II	Mittel
C	43,39	43,58	43,11	43,35
H	4,23	4,35	4,35	4,35
N	6,09	6,01	—	6,01
S	9,28	—	9,09	9,09
O	37,01			37,20

*) Drechsel, Journ. f. prakt. Chemie **27**, 418 (1883).

Wie die Formel lehrt, hat hier im Gegensatz zum Benzoylprodukt keine Sauerstoffabgabe stattgefunden. Der ungleiche Gehalt an Schwefel und Stickstoff weist darauf hin, daß bei der offenbar sehr verwickelten Reaktion zum Teil eine Zersetzung des Taurins Platz gegriffen hat.

Die große Kristallisierbarkeit des Produktes, die charakteristische Beschaffenheit der Kristalle und der scharfe Schmelzpunkt machen eine weitere Untersuchung des Produktes, auch im Hinblick auf seine Verwendung zum Nachweise des sonst schlecht charakterisierten Taurins wünschenswert.

G. Pellizzari und V. Matteucci*) haben durch Erhitzen von Taurinkalium und Phtalsäureanhydrid auf 160° das Kaliumphtalimidisaethionat $C_6H_4 : (CO)_2 : N . C_2H_4 . SO_3K$ in monoklinen Kristallen erhalten. Sie gingen hiebei von dem Gedankengange Schiffs aus, daß, wenn in den Aminosulfosäuren der Säurecharakter der Sulfongruppe durch Alkali neutralisiert werde, die Amingruppe wieder zu ihrer ganzen Wirkung gelange.

Taurin und Formaldehyd.

Nach H. Schiff**) nimmt Taurin ein Molekül Formaldehyd auf. Ich versuchte, das entstandene Methylentaurin zur Analyse zu bringen; dies scheiterte jedoch an seiner großen Zersetzlichkeit. Der beim Zusammenbringen von äquivalenten Mengen Formaldehyd und Taurin entstandene, stark sauer reagierende Körper, welcher aus Karbonaten Kohlensäure austreibt, ist so wenig haltbar, daß er schon beim Versetzen der wässerigen Lösung mit Alkohol Taurin ausfallen läßt und auch im trockenen Zustande über Schwefelsäure anhaltend Formaldehyd verliert. Demgemäß ergab sich bei der Analyse des trockenen Produktes, daß sich zum großen Teil wieder Taurin zurückgebildet hatte.

Die im Hinblicke auf die leichte Veresterbarkeit anderer Aminofettsäuren versuchte Darstellung des salzsauren Methyl-, Äthyl- und Amylesters nach Curtius gelang weder in der Kälte, noch bei gesteigerter Temperatur.

Während Salkowski***) durch Anlagerung von Kaliumcyanat leicht zur Taurokarbaminsäure gelangte, glückte es mir nicht, bei Anwendung des Phenylisocyanates nach Paal†) die homologe Phenylureidosäure zu erhalten.

Taurin und Cyanamid.

Durch Erhitzen von Taurin mit Cyanamid haben R. Engel††) und Dittrich†††) aus Taurin das dem Kreatin entsprechende Tauro-

*) Pellizzari und Matteucci, Liebigs Annalen **248**, 152 (1888).

) Hugo Schiff, Liebigs Annalen **310, 25 (1899) und **319**, 59 (1901).

***) Salkowski, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **6**, 1190 (1873).

†) C. Paal, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **27**, 974 (1894).

††) R. Engel, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **8**, 1597 (1875).

†††) Eugen Dittrich, Journal f. prakt. Chemie, Neue Folge **18**, 63 (1878).

cyamin (Tauroglykocyamin) erhalten, dessen Schmelzpunkt zu 224 bis 226° und 260° angegeben wird. Wie ich mich überzeugte, reagiert Taurin auch beim Schmelzen mit der äquivalenten Menge Guanidinkarbonat. Die Masse verflüssigt sich bei 180°, wobei unter lebhaftem Schäumen Ammoniak entweicht. Nach einer Stunde erhält man eine homogene, farblose Schmelze, die beim Erkalten gelatinös erstarrt. Das Produkt ist aber kein einheitliches. Beim Behandeln mit Methylalkohol fällt aus der Lösung der Schmelze ein weißes, feines Pulver aus; der Methylalkohol hinterläßt beim Verdunsten eine weiße, intensiv bittere, gelatinöse Masse. Das pulverförmige Produkt enthält zum mindesten zwei verschiedene Substanzen, eine in kaltem Wasser leicht und eine in demselben nur schwer lösliche; die erstere kristallisiert aus wässeriger Lösung beim Verdunsten in alkoholunlöslichen, porzellanartigen, rhombischen Tafeln vom Schmelzpunkt 255°, die zweite in seidenglänzenden, fächerförmig angeordneten Nadeln.

Wie die Einführung von Alkylgruppen, stößt auch jene von Säureradikalen beim Taurin auf größere Schwierigkeiten als bei den Monaminofettsäuren. Weder die Acetylierung nach C. Liebermann und O. Hörmann, noch die Benzoylierung nach Schotten-Baumann, sei es bei Anwendung von Lauge, sei es von Pyridin, gab ein greifbares Resultat. Ebensowenig die Behandlung mit Benzolsulfochlorid nach Hedin*).

Taurin und Cholsäure.

Die Schwierigkeit, an das nicht an Alkali gebundene Taurin Säureradikale anzulagern, läßt es von vornherein wenig wahrscheinlich erscheinen, daß die Taurocholsäure im Tierkörper durch Anlagerung von Cholsäure an Taurin unter Wasseraustritt entsteht. Sehr bemerkenswerterweise verhält sich aber, wie die folgenden Versuche zeigen, die Cholsäure dem Taurin gegenüber anders als die bisher zur Acylierung benutzten Säuren.

Fein gepulvertes Taurin wird mit der berechneten Menge von Natriumcholat (am besten darstellbar durch Kochen einer Cholsäureaufschwemmung in Wasser mit einer zur Auflösung nicht vollkommen genügenden Menge von Natriumkarbonat) innig gemengt und im Ölbade geschmolzen. Bei 245° beginnt die Masse sich gelblich zu färben und Wasser abzugeben.

Nach einstündigem Schmelzen bei 265° resultiert unter nur geringem Schäumen eine grünlich-gelbe, homogene, zähflüssige, in glänzende, glasartige Fäden ausziehbare, beim Erkalten sofort erstarrende Masse, die sehr an Dyslysin erinnert. Sie läßt sich leicht zu einem feinen, leichten Pulver zerreiben.

---

*) S. G. Hedin, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **23**, 3197 (1890).

Das Produkt ist in Wasser und 95proz. Alkohol leicht löslich; in absolutem Alkohol bleibt ein geringer Anteil ungelöst, auch in der Wärme. Die alkoholische Lösung fluoresziert.

Aus der schwach alkalisch reagierenden wässerigen Lösung läßt sich durch vorsichtigen Säurezusatz Cholsäure nicht ausfällen. Hingegen läßt sich dieselbe aus der erhaltenen Verbindung durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure als harziger, in Alkohol löslicher Niederschlag von der Beschaffenheit des Dyslysins abspalten.

Auf Zusatz von Kupfersulfat, Silbernitrat, Bleiacetat, Quecksilberacetat und Quecksilberchlorid zur wässerigen Lösung fällt kein Niederschlag aus. Bleiessig mit etwas Ammoniak läßt einen dichten, weißen Niederschlag ausfallen.

Die absolut-alkoholische Lösung der Schmelze gibt mit Äther einen weißen, dichten, flockigen Niederschlag, der, ebenso wie die „Pattnersche Galle", wenn noch ätherhaltig, an der Luft zerfließt. Aus der über dem Niederschlag stehenden klaren Lösung läßt sich durch weiteren Ätherzusatz ein gleicher Niederschlag in beträchtlicher Menge ausfällen. Da es nicht gelingen wollte, die Substanz zur Krystallisation*) zu bringen, wurde der mit Äther gewaschene, rasch abgepreßte Niederschlag 24 Stunden im Vakuumexsikkator — unter bedeutender Gewichtsabnahme — getrocknet.

Derselbe stellte dann ein weißes, amorphes, lockeres, an der Luft nicht mehr zerfließliches Pulver dar, das zur weiteren Reinigung nochmals in absolutem Alkohol gelöst, mit Äther gefällt und auf dieselbe Weise getrocknet wurde.

Die mit Essigsäure versetzte wässerige Lösung des so gereinigten Pulvers fällt Eiweiß in weißen, groben Flocken, wie dies Maly und Emich**) für die Taurocholsäure angegeben haben. Der Niederschlag war wie bei den genannten Autoren -- nach denselben bildet sich eine Verbindung von Eiweiß und Taurocholsäure — alkoholunlöslich, hingegen löslich in Alkalien. In fernerer Übereinstimmung mit den Angaben von Maly und Emich wird aus der angesäuerten wässerigen Lösung durch eine Albumoselösung ein milchiger Niederschlag gefällt, der in Alkohol zum größten Teil löslich ist.

Die Analyse ergab Zahlen, die sich mit zunehmender Reinigung jenen des taurocholsauren Natrons näherten.

---

*) Inzwischen ist es, wie mir Herr Prof. Hofmeister mitteilt, Herrn Dr. G. Embden gelungen, die synthetische Taurocholsäure in kristallisierter Form zu gewinnen.

) Rich. Maly und Friedr. Emich, Malys Jahresber. **13, 289 (1884) und Monatshefte für Chemie **4**, 89 (1883).

Ein dreimal mit Alkohol und Äther behandeltes Präparat lieferte folgende Zahlen:

0,1529 der im Vakuum über Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz gebrachten Substanz gaben 0,3251 CO_2 = 57,99 Proz. C und 0,1204 H_2O = 8,81 Proz. H.

0,1238 Substanz gaben bei 15,2° und 753,5 mm B 3,80 ccm N = 3,58 Proz. N.

0,2047 Substanz gaben 0,0941 $BaSO_4$.

0,3126 Substanz gaben 0,0434 Na_2SO_4.

	Berechnet für taurocholsaures Natrium $C_{26}H_{44}NSO_7 . Na$	Gefunden:
C	58,05 Proz.	57,99 Proz.
H	8,25 „	8,81 „
N	2,61 „	3,58 „
S	5,97 „	6,31 „
O	20,84 „	—
Na	4,28 „	4,50 „

Trotz der Unvollkommenheit der Übereinstimmung, wie sie sich aus der nicht kristallinischen Natur des Produktes erklärt, kann auf Grund der oben angeführten Reaktionen nicht wohl ein Zweifel bestehen, daß eine Anlagerung von Cholsäure an Taurin stattgefunden hatte und dabei die Bildung einer mit Taurocholsäure identischen oder isomeren Substanz zustande gekommen war.

Daß hier eine Acylierung erfolgt ist, kann daran liegen, daß nicht Cholsäure als solche, sondern das Salz derselben zur Verwendung kam, ähnlich wie umgekehrt bei dem Versuche von Pellizari und Matteucci Taurinkalium statt des freien Taurins.

XXVIII.

Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe.

Von **Ivar Bang**.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium zu Lund, Schweden.)

Zweite Mitteilung.

Über die Konstitution des nativen Histonnucleinats.

Sättigt man eine Lösung des Histonnucleinats mit pulverförmigem Kochsalz, so wird sie schon vor Eintritt der Sättigung dickflüssig, bald darauf undurchsichtig und weiß, etwa wie eine Aufschwemmung eines sehr feinen Pulvers in Pflanzenschleim. Nach einiger Zeit wird die Flüssigkeit dünnflüssiger und setzt einen reichlichen, weißen Bodensatz ab, welchen man durch Filtration sammeln kann. Da die Sättigung mit Kochsalz sehr langsam von statten geht, gibt das Filtrat, wenn man es neuerdings längere Zeit mit Salz schüttelt, gewöhnlich noch eine Fällung. Es zeigt auch, wenn es vollständig mit Kochsalz gesättigt ist, stets noch eine schöne, rote Biuretreaktion. Ich habe wiederholt die Filtrate bis zum Auskristallisieren des Kochsalzes verdunsten lassen und niemals die Biuretreaktion vermißt.

Diese Beobachtung steht zu einer früheren inzwischen von Malengreau bestätigten Angabe von mir im Widerspruch, derzufolge es gelingen sollte, das Eiweiß mit Kochsalz so vollständig abzuscheiden, daß das Filtrat keine Biuretreaktion mehr zeigt. Ich habe keine Mühe gespart, diesen Widerspruch aufzuklären, und habe zu diesem Zweck meine Versuche in der verschiedensten Weise abgeändert, jedoch ohne Erfolg.

Das nucleinsaure Histon enthält sonach einen Eiweißkörper, welcher nicht mit Kochsalz abgeschieden werden kann. Dagegen hat es sich bestätigt, daß der durch Kochsalzsättigung erhältliche Niederschlag aus Histon besteht und daß man aus dem Filtrate die Nucleinsäure mit Alkohol niederschlagen kann.

Die Untersuchung der Spaltungsprodukte des nucleinsauren Histons zerfällt somit in drei Abschnitte: die Untersuchung 1. des Histons, 2. der biuretgebenden Substanz und 3. der Nucleinsäure.

1. Das Histon.

Bei seinen Untersuchungen über die Thymusproteide glaubte Malengreau gefunden zu haben, daß die Thymus zwei Histone enthält, welche sich hauptsächlich durch ihre Fällungsgrenzen gegenüber Ammoniumsulfat unterscheiden. Das A-Histon, welches nach Malengreau aus dem A-Nucleoalbumin herstammt, hat dieselben Fällungsgrenzen wie das Proteid, und das gleiche ist der Fall mit dem B-Histon, welches dem B-Nucleoalbumin entspricht.

In meiner ersten Mitteilung habe ich gezeigt, daß Malengreaus A-Nucleoalbumin mit Huiskamps und meinem Nucleoproteid, welches nicht Histon, wohl aber ein Albuminat enthält, übereinstimmt, und weiter, daß das B-Nucleoalbumin dem Histonnucleinat (in unreinem Zustande) entspricht. Weiter habe ich nachgewiesen, daß sich in der Thymus alles Histon in dem Nucleinat vorfindet.

Wenn also Malengreaus Befunde richtig sind, müssen sich beide Histone aus dem Nucleinat darstellen lassen.

Indessen habe ich vorgezogen, zuerst Malengreaus Beobachtung nachzuprüfen, und habe versucht, nach seinen Vorschriften die Histone aus Thymus direkt darzustellen. In der Tat ließen sich auch durch fraktionierte Ausfällung zwei Histone mit konstanten Fällungsgrenzen darstellen. Außerdem enthält auch das Salzsäureextrakt der Thymusdrüse das schon vorher besprochene Albuminat, welches bei der Ausfällung der Histone mit Ammoniak teilweise mit niedergerissen wird und denselben auch nach mehrmaligem Umfällen noch anhaften kann. Es bildet somit eine noch nicht berücksichtigte Verunreinigung des Thymushistons.

Beide Histone wurden von Ammoniak niedergeschlagen und gaben die Kochprobe und Eiweißreaktion in der für Histone charakteristischen Art. Das A-Histon gab auch die Salpetersäureprobe und die Alkaloidreagenzprobe, während das B-Histon sich diesen gegenüber indifferent verhielt. Weiter wurde das A-Histon von 33 bis 43 Proz. Ammonsulfatsättigung und 15 bis 25 Proz. Kochsalzsättigung niedergeschlagen, während die Fällungsgrenzen des B-Histons zwischen 65 bis 85 (90) Proz. Ammonsulfatsättigung und 50 bis 75 Proz. Kochsalzsättigung lagen.

Damit waren weitere Beweise für die Existenz der beiden Histone beigebracht.

Zur Analyse wurden drei Präparate aus 3 kg Thymus dargestellt. Es wurden nur Stickstoffanalysen ausgeführt.

	A-Histon	B-Histon
No. 1	17,86 Proz. N	—
„ 2	17,86 „ „	18,12 Proz. N
„ 3	17,66 „ „	17,93 „ „
Durchschnitt	17,79 Proz. N	18,03 Proz. N

Es ergab sich somit, daß beide Histone ungefähr denselben Stickstoffgehalt besitzen.

Bei der Darstellung meiner Präparate fiel es auf, wie verschieden die Ausbeute an den beiden Histonen war. In dem ersten Versuch bekam ich so wenig B-Histon, daß es nicht zu einer Analyse genügte, trotzdem 1 kg Thymus verarbeitet worden war. Im dritten Versuch überwog dagegen die Menge des B-Histons bei weitem. Man mußte hiernach die Existenz zweier Histone bezweifeln. Eine Entscheidung gab der folgende Versuch.

Aus dem Wasserextrakte der Thymus schlug ich alles Histon als Kalknucleinat mit Chlorkalzium nieder. Der Niederschlag wurde in zwei Portionen **a** und **b** geteilt. Portion **a** wurde mit 2proz. Kochsalzlösung erschöpft, aus der Lösung alles Histon mit Kochsalz gefällt. (2proz. Kochsalzlösung extrahiert die ganze Histonverbindung aus dem Chlorkalziumniederschlag, das B-Histon wird bei $^3/_4$ Sättigung mit NaCl vollständig gefällt.) Das Histon wurde im Wasser gelöst und mit Ammonsulfat fraktioniert: nur A-Histon wurde gefunden. (Ein Teil wurde mit 0,8proz. Salzsäure gespalten, das Histon mit Ammoniak niedergeschlagen, der Niederschlag in Salzsäure gelöst und die Lösung neutralisiert: nur A-Histon war vorhanden.)

Portion **b** wurde direkt mit 0,8proz. Salzsäure extrahiert, filtriert und das Histon durch Sättigung mit Kochsalz gefällt, der Niederschlag wurde im Wasser gelöst und mit Ammonsulfat fraktioniert: es wurde B-Histon neben geringen Spuren von A-Histon erhalten.

Wenn danach A- und B-Histon identische Körper sind, so bleibt zu untersuchen, warum sie Unterschiede 1. in den Fällungsgrenzen, 2. der Salpetersäureprobe und 3. der Alkaloidreagenzprobe darbieten.

1. In betreff der Fällungsgrenzen war daran zu denken, daß sie vielleicht durch alkohollösliche Substanzen, z. B. das Lecithin, verschoben werden. Doch ist dies nicht der Fall. Bei mit Alkohol und Äther erschöpftem Thymus kommt man zu denselben Resultaten wie oben. Dagegen ist, wie ich später zeigen will, per analogiam wahrscheinlich, daß die Histonkomponente als eine

polyvalente Base mit Säuren verschiedene Salze bildet, und es erscheint denkbar, daß diese sich gegenüber Ammonsulfat verschieden verhalten. Doch kann man auch an andere Möglichkeiten denken.

2. Der Salpetersäureprobe darf man keinen zu großen Wert beilegen. Ich habe auch mit „B-Histon“ einige Male Niederschläge erhalten, und mitunter sind sie bei „A-Histon“ wenig prägnant. Der Niederschlag löst sich beim Erwärmen auf und kehrt beim Erkalten wieder. Es kommt jedoch öfter vor, daß er sich nicht löst.

Ohne bestimmtere Angaben machen zu können, stehe ich unter dem Eindruck, daß hier die Konzentration der Histonlösung, der Salzgehalt, die Menge der zugefügten Salpetersäure von Einfluß ist.

3. Die Alkaloidprobe ist eine der zuverlässigsten Histonreaktionen, und es fiel mir sehr auf, daß sie bei „B-Histon“ versagte. Nach vielen Bemühungen fand sich eine einfache Erklärung: Kleine Beimengungen von Ammonsulfat (und das „B-Histon“ war durch Sättigung damit dargestellt) verhinderten völlig die Reaktion. Setzt man zu einem Niederschlage von Histon und Alkaloidreagens einige Tropfen Ammonsulfatlösung, so verschwindet der Niederschlag augenblicklich*).

Im Gegensatz zu Malengreau finde ich somit, daß Thymus nur ein Histon enthält, das sich ausschließlich im Histonnucleinat findet.

Obwohl ich einige Analysen des Thymushistons schon mitgeteilt habe und diese auch für das aus dem Histonnucleinat erhaltene Histon zutreffen dürften, habe ich noch verschiedene Histonpräparate aus Nucleinat dargestellt und analysiert.

Der Stickstoffgehalt wurde zu 18,18 Proz. gefunden, was mit den oben mitgeteilten Analysen übereinstimmt. In meinen „Bemerkungen über das Nucleohiston“ habe ich für das Histon einen Stickstoffwert von 18,05 Proz. angegeben. Huiskamp gibt durchschnittlich 18,09 Proz. an, während meine ursprünglichen Analysen (Studien über Histon) 18,35 Proz. ergaben. Denselben Wert hat auch Fleroff gefunden.

Meine ersten Schwefelanalysen gaben kein übereinstimmendes Resultat, da das Histon leicht mit einem schwefelreichen Körper verunreinigt erhalten wird. Nach mehrmaligem Umfällen bekam ich schließlich Präparate von konstanter Zusammensetzung. Der Schwefelgehalt

*) In meiner norwegischen Publikation habe ich mitgeteilt, daß man auch aus dem Histonnucleinat bzw. der Kochsalzfällung sowohl A-, als B-Histon darstellen kann. Dies trifft für die Kochsalzfällung nicht zu. Was ich hier als B-Histon bezeichnete, waren nur Reste des „A-Histons“, wie später nach Fällung und Auflösung erkannt wurde.

war 0,64 Proz., 0,60 Proz. und 0,60 Proz., im Durchschnitt **0,61** Proz. S. Fleroff hat bei einer Analyse des Thymushistons 0,62 Proz. S gefunden.

C- und **H**-Analysen habe ich nicht ausgeführt. Es liegen jedoch gut übereinstimmende Analysen von anderer Seite vor. Lilienfeld hat 52,34 Proz. C und 7,31 Proz. H, Fleroff 52,37 Proz. C und 7,70 Proz. H gefunden.

Die elementare Zusammensetzung des Thymushistons ist also im Mittel: **52,35** Proz. C, **7,50** Proz. H, **18,10** Proz. N, **0,62** Proz. S.

Ehe ich die Histone verlasse, möchte ich mit einigen Worten meine Auffassung des Histonbegriffs präzisieren. In meiner einschlägigen Abhandlung habe ich die Histone als Körper definiert, welche die fünf von mir aufgestellten Histonreaktionen aufweisen. Diese Auffassung trifft jetzt nicht mehr zu, da man seitdem Histone beschrieben hat, welche nicht alle diese Reaktionen geben, wie Ehrströms Lotahiston, welchem die Salpetersäureprobe abgeht, Mathews Arbacin, das höchstens eine unvollständige Ammoniakreaktion gibt, Fleroffs Parahiston — nach meiner Ansicht ein veritables Histon — das weder die Histonreaktionen beim Kochen und mit Salpetersäure, noch die Ammoniakreaktion aufweist. Von den fünf Reaktionen bleiben somit nur zwei, die Alkaloidreagenzprobe und die Eiweißreaktion übrig. Diese sind zwar stets vorhanden, aber nicht spezifisch, da sie auch den Protaminen zukommen. (Übrigens habe ich schon in meiner ersten Arbeit den geringeren Wert der anderen drei Reaktionen angedeutet.)

Nach meiner Ansicht kann man denn auch die Histone und Protamine zu einer gemeinsamen Eiweißgruppe vereinigen.

Ich werde in aller Kürze diesen Vorschlag begründen:

1. Sowohl die Histone wie die Protamine sind basische Körper, welche sich mit Säuren zu Salzen verbinden.

2. Beide geben mit genuinen Eiweißkörpern Niederschläge, welche aus Eiweiß und Histon bzw. Protamin bestehen.

3. Beide werden von den Alkaloidreagentien bei neutraler Reaktion niedergeschlagen.

4. Die Histone und Protamine besitzen einen hohen Gehalt an basischen Gruppen (Hexonbasen). Die Protamine enthalten davon 88 Proz. bis 68 Proz., die Histone von 40 Proz ab. Millons Reaktion fällt gewöhnlich bei den Protaminen negativ aus (jedoch bei Cyclopterin positiv) und ist bei den Histonen immer nur schwach.

5. Die Histone und Protamine vertreten einander oft. Das unreife Fischsperma enthält nucleinsaures Histon, welches bei der

Reifung in nucleinsaures Protamin übergeht. Übrigens persistiert bisweilen das nucleinsaure Histon auch im reifen Sperma.

Gegen diese Gruppierung könnte man den Einwand erheben, daß die absolute Menge der Diaminosäuren in den Protaminen viel größer ist als im Histon. Vergleicht man aber die verschiedenen Protamine miteinander, so findet man unter ihnen ebenso große Differenzen, wie zwischen Histon und Protamin. So enthält Salmin 20 Proz. mehr basische Spaltungsprodukte als Cyclopterin und dieses nur 29 Proz. mehr als Gadushiston. Das Cyclopterin steht also dem Gehalt an Basen nach ebenso weit vom Salmin ab als vom Histon.

Dem Gehalt an basischen Spaltungsprodukten nach ist es kaum möglich, die Histone als eine besondere Eiweißgruppe zu charakterisieren. Die Heteroalbumose enthält ebensoviel Diaminosäuren als jedes Histon. Wollte man auch die Heteroalbumose deswegen als Histon bezeichnen, so scheitert man am kristallisierten Serumalbumin mit 33 Proz. Diaminostickstoff, das doch sicher kein Histon ist; auch sind mehrere Histone nicht auf ihre basischen Kerne untersucht. Einige davon enthalten weniger Stickstoff und werden vermutlich auch weniger Basen liefern. Ich finde daher keinen Anlaß, mit Kossel das Parahiston aus der Histongruppe auszuscheiden, weil es nur 13 Proz. Hexonbasen enthält. Das Parahiston besitzt doch alle wesentlichen Eigenschaften eines Histons.

Früher hat man auch den Protaminen ein viel kleineres Molekül als den Histonen zugeschrieben. Seit aber Kossel gezeigt hat, daß die Protamine ein großes Molekulargewicht besitzen, ist auch dieser Unterschied unhaltbar.

Daß die Histone Verbindungen von Eiweiß und Protamin sind, wird jetzt wohl niemand mehr annehmen.

2. Die biuretgebende Substanz (Parahiston).

Wie schon bemerkt, gibt das mit Kochsalz gesättigte Filtrat eine deutliche Biuretreaktion und enthält somit einen Eiweißkörper, welcher nicht Thymushiston ist. Man könnte diese Tatsache als eine Bestätigung der Existenz des Nucleohistons deuten und annehmen, daß die Kochsalzsättigung das Nucleohiston in Histon und Leukonuclein spaltet. Eine solche Auffassung wäre jedoch unhaltbar, denn erstens geht die Substanz in Alkohol über, und zweitens wird sie auch durch Salzsäure und Baryt ganz ebenso wie das Histon von der Nucleinsäure abgespalten. Sie ist somit wahrscheinlich mit der Nucleinsäure in derselben Weise verbunden, eine Auffassung, die ich später näher begründen werde.

Um die Substanz darzustellen, schlug ich zuerst im Filtrate des Histonniederschlages die Nucleinsäure mit Alkohol nieder und versetzte das jetzt erhaltene Filtrat mit einem Überschuß von Äther. Auf diese Weise erhielt ich aber den Körper mit allzuviel Salz verunreinigt. Auch war die Abscheidung nur unvollständig. In 96proz. Alkohol erwies er sich sogar als ziemlich leicht löslich.

Zu einem besseren Resultat kam ich, als ich das native nucleinsaure Histon mit 0,5proz. Salzsäure zerlegte. Das Histon wurde mit Ammoniak ausgefällt und das Filtrat mit Alkohol und Äther versetzt. Der Niederschlag wurde im Wasser gelöst, aufs neue mit Ammoniak behandelt, das Filtrat wieder mit Alkoholäther versetzt, bis man nach drei bis vier Umfällungen zu einer Lösung kam, welche keinen Niederschlag mehr mit Ammoniak, Salpetersäure und Kochsalzsättigung gab und somit kein Histon mehr enthielt. Dagegen waren nun alle Reaktionen des Parahistons von Fleroff und mir, welche ich hier nicht neuerdings anzuführen brauche, positiv.

Die Identifizierung mit Parahiston gelang durch die Analyse. Nach Fleroff enthält das Parahiston 51,84 Proz. C, 7,93 Proz. H, 17,84 Proz. N und 1,99 Proz. S. Meine Analysen ergaben 2,23 Proz. S und 17,72 Proz. N.

Die biuretgebende Substanz im Filtrate des Histonniederschlages ist somit Parahiston. Andere Eiweißkörper ließen sich nicht nachweisen. Das native nucleinsaure Histon enthält somit von Eiweißkörpern nur Histon und Parahiston, und zwar letzteres den Niederschlägen nach in viel geringerer Menge.

3. Die Nucleinsäure.

Diese ist der dritte Bestandteil des Histonnucleinats. Sie wurde in Übereinstimmung mit meinen früheren Angaben auf folgende Weise dargestellt:

Man versetzt das mit Kochsalz gesättigte Filtrat mit 2 Vol. Alkohol. Die Nucleinsäure scheidet sich in großen zähen Klumpen aus, welche wie ein Fibringerinnsel an dem Glasstabe haften. Der Niederschlag ist ganz weiß und einer Mucinfällung durch Essigsäure sehr ähnlich. Die Nucleinsäure wird so als Alkalisalz gefällt. Dieses ist in Wasser leicht löslich und wird daraus nochmals mit Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag ist dann schon von Salzen, besonders Kochsalz ziemlich frei. Seine Lösung wird dem entsprechend jetzt von Alkohol nur nach Zusatz von einigen Tropfen Kochsalzlösung, und zwar in Form weißer Flocken gefällt. Diese werden mit Alkohol ausgewaschen.

Bei fortgesetzter Alkoholätherbehandlung erhält man das nucleinsaure Alkali als ein feines, weißes Pulver, welches sich in

Wasser sehr leicht mit neutraler Reaktion löst. Eine solche Lösung gibt nicht die geringste Andeutung einer Biuretreaktion und ist absolut chlorfrei. Mit den Salzen der Schwermetalle, besonders mit Blei- und Kupfersalzen bekommt man Niederschläge der betreffenden Metallverbindungen der Nucleinsäure. Silber- und Quecksilbersalze geben jedoch mit der Nucleinsäure keine oder nur eine sehr unvollständige Fällung. Alkohol schlägt dann die Silber- und Quecksilberverbindung ziemlich vollständig nieder. Die Nucleinsäure wird von verdünnter Essigsäure absolut nicht gefällt, wohl aber von einer 25proz., ebenso auch von ganz verdünnten Mineralsäuren. Von diesen wird aber die Nucleinsäure rasch zerstört. Schon nach kurzer Zeit lassen sich Purinbasen und Phosphorsäure im Filtrate nachweisen.

Hält man eine Lösung des nucleinsauren Alkalis einige Zeit bei 60°, so bewirkt ein Zusatz von Salzsäure keinen Niederschlag mehr. Silbernitrat und Ammoniak bewirken aber noch keine Fällung. Kocht man dagegen die Nucleinsäure kurze Zeit mit verdünnten Mineralsäuren, so lassen sich die Purinbasen leicht nachweisen, wie dies den Angaben aller früheren Untersucher der Thymusnucleinsäure entspricht. Ebenso reduziert eine Nucleinsäurelösung nach Inversion mit einer Mineralsäure die Fehlingsche Lösung nicht. Die Nucleinsäure gibt weiter eine schöne Pentosenreaktion mit Phloroglucin und Salzsäure. Eine Lösung des nucleinsauren Alkalis kann mit Neutralsalzen gesättigt werden, ohne daß Nucleinsäure ausgefällt wird — im Gegensatz zu meiner Angabe in der vorläufigen Mitteilung, derzufolge man mit Ammonsulfat die Säure teilweise niederschlagen kann. Sättigt man dagegen eine Lösung des nucleinsauren Alkalis mit Ammonsulfat, so kann man durch einige Tropfen Essigsäure die ganze Säure ausfällen. Diese Fällung ist auch im Wasser leicht löslich und wird durch Sättigung mit Ammonsulfat neuerdings ausgefällt. Die Nucleinsäurefällung und Lösung reagiert aber auch nach oft wiederholtem Umfällen deutlich sauer. Bei Zusatz verdünnter Essigsäure wird also dem nucleinsauren Alkali ein Teil des Alkalis entrissen, und es entsteht ein saures nucleinsaures Alkali, welches zwar auch im Wasser löslich ist, aber mit Ammonsulfat ausgesalzen werden kann.

Um die Zusammensetzung der Nucleinsäure zu ermitteln, analysierte ich das Alkalisalz, nicht die freie Säure. Diese wird nämlich durch Umsetzung mit Salzsäure dargestellt, und bei Anwendung von Mineralsäure läuft man selbst bei vorsichtiger Arbeit Gefahr, die Nucleinsäure zu zersetzen. Beim Trocknen

des nucleinsauren Alkalis (Natron) bei 100° zeigte es sich indessen, daß auch diese Präparate sich unter Bräunung zersetzten. Ich mußte deswegen meine Präparate bei 50° im Exsikkator trocknen — ganz wie Schmiedeberg für die Salmonucleinsäure vorgegangen ist. Erst nach einigen Monaten erreichte ich Gewichtskonstanz. Die Präparate waren dann noch ganz weiß und in Wasser vollkommen löslich. Doch waren sie etwas hygroskopisch geworden. Sie hatten im ganzen 6 Proz. Wasser abgegeben.

Die Analysen wurden an vier Präparaten ausgeführt.

	C	H	N	P	Na
Präparat I	35,75 Proz.	4,18 Proz.	15,45 Proz.	9,34 Proz.	—
„ I	—	—	—	9,30 „	—
„ II	35,95 „	4,27 „	15,48 „	9,47 „	—
„ III	—	—	15,06 „	9,33 „	6,46 Proz.
„ IV	—	—	15,05 „	9,07 „	6,03 „
Mittel:	35,85 Proz.	4,23 Proz.	15,26 Proz.	9,30 Proz.	6,25 Proz.

Man darf, wie für die übrigen Nucleinsäuren auch für die vorliegende annehmen — wie übrigens schon für die Thymusnucleinsäure geschehen ist — daß sie vier Phosphoratome enthält. In der Tat stimmen meine Analysenresultate — besonders die P- und Na-Werte annähernd mit der Formel der Thymusnucleinsäure nach Herlant überein, übrigens derselben Formel, welche Schmiedeberg für die Salmonucleinsäure aufgestellt hat: $C_{40}H_{56}N_{14}P_4O_{26}$.

	Berechnet für $C_{40}H_{52}Na_4N_{14}P_4O_{26}$	Gefunden
C	35,30 Proz.	35,85 Proz.
H	3,83 „	4,23 „
Na	6,76 „	6,25 „
N	14,41 „	15,26 „
P	9,12 „	9,30 „

Ob hier eine Verwandtschaft bzw. Identität mit der Salmonucleinsäure besteht, war nur durch Untersuchung der Spaltungsprodukte zu entscheiden.

Zu diesem Zwecke wurde die Nucleinsäure in einem Versuche mit 5proz. Schwefelsäure drei Stunden im Wasserbade gekocht, in einem anderen zwei Stunden im Autoklaven mit 30proz. Schwefelsäure bis 150° erhitzt.

Nach der Inversion mit 5proz. Schwefelsäure ließ sich keine reduzierende Substanz nachweisen. Dagegen waren die Purin-

basen vollständig abgespalten. Nach Ausfällung derselben konnte man mit Quecksilbernitrat einen Niederschlag gewinnen, welcher Thymin, Phosphorsäure und die „Pentose“ enthielt, welche Stoffe dementsprechend fester untereinander verbunden sind als mit den Purinbasen. Diese Verbindung kann nicht der Thyminsäure entsprechen, da eine Ausfällung der Purinbasen durch Silbernitrat stattfinden kann. Auch läßt sich die Thyminsäure aus dieser Nucleinsäure nach Kossels Methode isolieren.

Was die Natur der Purinbasen betrifft, so ließen sich Hypoxanthin und Xanthin bald ausschließen. Dagegen fand sich Adenin in reichlicher Menge. In meiner ersten Untersuchung, wo ich nur mit unvollständig gereinigter Nucleinsäure arbeitete, hatte ich kein Guanin gefunden. Genauere Untersuchungen mit reinem Materiale, das übrigens auch eine schöne Murexidprobe gab, ergaben jedoch seine Anwesenheit. Auch bei der Bestimmung der Purinbasen bin ich zuerst zu einem unrichtigen Resultate gekommen. Erst als ich die Silberfällung mehrmals aus 20proz. Salpetersäure unter Zusatz von Harnstoff umkristallisierte, ließen sich sowohl reines Adenin als Guanin nachweisen. Die Silbersalze wurden mit Salzsäure zerlegt und das Adenin vom Guanin mit Ammoniak getrennt. Die Adeninmenge war zweimal so groß wie die Guaninmenge (etwa 0,5 : 0,25 g), ganz in Übereinstimmung mit Kossels Befund, welcher aus 10 g Thymusnucleinsäure 1,2 g Adenin und 0,6 g Guanin darstellen konnte.

Nach ihren qualitativen Reaktionen ist also meine Nucleinsäure mit jener Kossels ganz identisch, und da Kossel seine Nucleinsäure nach einem Verfahren dargestellt hat, wonach man, wie gezeigt, die Nucleinsäure aus dem Histonnucleinat darstellen kann, so ist die Identität beider sichergestellt.

Bei der Bestimmung der absoluten Basenmenge erhielt ich als Resultat etwa 22 Proz. Basen, Kossel approximativ 18 Proz.

Aus dem ungefähr bekannten Molekulargewicht der Nucleinsäure (= 1272) läßt sich berechnen, daß sie zwei Moleküle Purinbasen (1 Molekül Adenin + 1 Molekül Guanin = 22,4 Proz.) enthält. Diese Beobachtung stimmt vollständig mit Schmiedebergs Befund an der Salmonucleinsäure überein, läßt sich aber nicht mit dem gefundenen Verhältnis der beiden Basen, zwei Teile Adenin auf einen Teil Guanin vereinigen.

Was sonstige stickstoffhaltige Spaltungsprodukte betrifft, so gibt die Nucleinsäure kein Ammoniak ab. Bei Destillation mit Magnesia ging nichts davon über.

Dagegen habe ich sowohl Thymin als Cytosin gefunden. Thymin kommt in viel größerer Menge als Cytosin vor. Das Cytosin ließ sich nach einer Kombination der Methoden von Kossel und Steudel und Kutscher nachweisen. Allerdings habe ich nur verhältnismäßig geringere Mengen Nucleinsäure darauf verarbeitet. Kossel schätzt die relativen Mengen des Thymins und Cytosins in der Thymusnucleinsäure auf 8 : 2.

Andere stickstoffhaltige Substanzen habe ich aus der Nucleinsäure nicht darstellen können.

Von sonstigen Spaltungsprodukten habe ich Lävulinsäure (nebst Ameisensäure) nachweisen können. Dagegen enthält die Nucleinsäure keine Pentose, der schönen Pentosenreaktion mit Phloroglucin und Salzsäure ungeachtet. Bei einem Versuch zur Bestimmung der vermutlichen Pentose nach Tollens ging keine Spur von Furfurol in die Vorlage über. Grund hat bei Untersuchung des „Nucleohistons" dasselbe gefunden, trotzdem Thymus selbst nicht unerhebliche Mengen Pentose enthält. Auch die Orcinprobe fällt ganz negativ aus. Hieraus geht hervor, daß Glykuronsäure nicht vorliegen kann. Die Orcinprobe ist darnach der Phloroglucinprobe bei weitem überlegen.

Die Nucleinsäure enthält somit, wie ich in Übereinstimmung mit Kossel finde, eine Kohlehydratgruppe, welche nicht als reduzierende Substanz abgespalten werden kann. Ob diese Gruppe die „Pentosenreaktion" bedingt, weiß ich nicht. Nach Erhitzen im Autoklaven fällt die „Pentosenreaktion" negativ aus.

Den Spaltungsprodukten nach besitzt entweder die Nucleinsäure ein außerordentlich großes Molekül, was nicht wahrscheinlich ist, oder es liegen mehrere, mindestens zwei, Nucleinsäuren vor.

Wenn wir uns hierüber näher orientieren wollen, müssen wir zwei Momente im Auge behalten: 1. Die absolute und relative Menge der Spaltungsprodukte und 2. die elementare Zusammensetzung der Nucleinsäure.

Von den Spaltungsprodukten kennen wir alle, oder jedenfalls mehrere stickstoffhaltige. Dagegen sind die stickstofffreien kohlenstoffhaltigen Spaltungsprodukte der Hauptmasse nach unbekannt. Da unsere Nucleinsäure sich den Reaktionen nach wie die Salmonucleinsäure verhält, ungefähr dieselbe prozentische Zusammensetzung und aller Wahrscheinlichkeit nach auch eine analoge Konstitution besitzt, so dürfen wir annehmen, daß in ihr als Kern eine Thymin- bzw. Cytosinsäure vorliegen. Liegen mehrere

Nucleinsäuren vor, so müssen sie sämtlich eine ähnliche Konstitution besitzen. Man darf somit annehmen, daß wir entweder eine Guanin- und eine Adeninnucleinsäure, oder eine Adenin- und eine Adenin-Guaninnucleinsäure vor uns haben. Ich glaube später beweisen zu können, daß letzteres der Fall ist.

In diesen können weiter als Komponenten eine Thyminsäure und eine Cytosinsäure oder eine Kombination von beiden vorliegen, und zwar in der einen oder der anderen oder in beiden Nucleinsäuren.

Wenn wir es aber mit einer Adenylsäure und einer Adenin-Guaninsäure zu tun haben, so erfordert die relative Basenmenge, vorausgesetzt, daß beide Nucleinsäuren je zwei Purinbasen enthalten, daß zwei Gewichtsteile Guanin-Adeninsäure auf einen Teil Adenylsäure kommen. Da nun das Thymin in weit reichlicherer Menge vorhanden ist als Cytosin, so ist es nicht unmöglich, daß die Adenin-Guaninsäure (ich nenne diese schlechtweg die Normalsäure) Thymin, und die Adenylsäure das Cytosin allein oder auch überdies Thymin enthält. Nehmen wir nach Analogie mit der Salmonucleinsäure, Triticonucleinsäure usw. an, daß zwei Moleküle Pyrimidinbasen vorliegen, so sollten im ersten Falle (Adenylsäure = Cytosinsäure und Normalsäure = Thyminsäure) 13 Proz. Thymin und 6 Proz. Cytosin erhalten werden. Ist aber die Adenylsäure eine Cytosin-Thyminsäure und die Normalsäure eine Thyminsäure, so haben wir in der „Nucleinsäure“ (= $^2/_3$ Normalsäure + $^1/_3$ Adenylsäure) 16,5 Proz. Thymin und 3 Proz. Cytosin zu erwarten. Kossel hat, wie erwähnt, nach seiner ursprünglichen, unvollkommenen Methode 8 Proz. Thymin und 2 Proz. Cytosin gefunden, was wohl besser mit der ersten Auffassung übereinstimmt. Haben doch Osborne und Harris in der Triticonucleinsäure bei quantitativem Arbeiten nur 11 Proz. Uracil anstatt der theoretischen Menge (16 Proz.) gefunden. Auch stimmt diese Auffassung am besten zu den analytischen Werten. Während nämlich die erste Alternative (16,5 Proz. Thymin und 3 Proz. Cytosin) einem Stickstoffgehalt der „Nucleinsäure“ (als Na-Salz) von 14,87 Proz. entspricht, stellt sich die Sache der anderen Auffassung nach in folgender Weise dar*).

---

*) Ich bemerke dazu, daß ich die Differenz des Kohlenstoffes zwischen Thymin und Cytosin nicht berücksichtige. Kennen wir doch die stickstofffreien Bestandteile der Nucleinsäuren nicht und wissen auch nicht, wie sich diese verteilen. Dagegen enthalten die Nucleinsäuren etwa 10 C auf 1 P, was mit meinen Analysen übereinstimmt.

	Berechnet $^2/_3$ Normalsäure $[(C_{40}H_{52}Na_4N_{14}P_4O_{26})_2]$ $+ ^1/_3$ Adenylsäure $= [C_{40}H_{50}Na_4N_{16}P_4O_{23}]$	Gefunden
C	35,49 Proz.	35,85 Proz.
H	3,80 „	4,23 „
Na	6,80 „	6,25 „
N	15,18 „	15,26 „
P	9,17 „	9,30 „

Über die absolute Richtigkeit der C- und H-Werte können wir vorläufig kein bestimmtes Urteil abgeben, dagegen stimmen die Na-, N- und P-Werte gut zu der ausgeführten Auffassung. Da aber nicht sämtliche Komponenten der Nucleinsäuren bekannt sind, so verzichte ich auf die Entwickelung einer Konstitutionsformel.*) Nur möchte ich hervorheben, daß sich sämtlicher Stickstoff in den Spaltungsprodukten findet, wenn man in der Normalsäure je ein Mol. Guanin und Adenin und zwei Mol. Thymin (= 14 Atome N) und in der Adenylsäure zwei Mol. Adenin und zwei Mol. Cytosin (= 16 Atome N) annimmt.

4. Ist das native Histonnucleinat eine einheitliche Substanz?

Bei der Untersuchung des nativen Histonnucleinats haben wir als Bestandteile kennen gelernt: Histon, Parahiston und zwei Nucleinsäuren. Es ergibt sich nun die Frage: Besteht das beschriebene Histonnucleinat in der Tat aus zwei Verbindungen, einem nucleinsauren Histon und einem nucleinsauren Parahiston, und, falls dies der Fall ist, wie verteilen sich die Nucleinsäuren an die Eiweißbasen?

Zur Lösung dieser Frage habe ich auf eine schon in der ersten Mitteilung angeführte Beobachtung zurückgegriffen.

Versetzt man eine Lösung des Histonnucleinats nach und nach mit gesättigter Kochsalzlösung, so erhält man bei Halbsättigung einen Niederschlag von Histon, welcher sich bei weiterem Zusatz vermehrt. Dabei ist bereits ein Teil des

*) An dieser Stelle möchte ich mit Bezug auf eine Bemerkung Kossels, ich hätte über seine Untersuchungen der Thymusnucleinsäure ein absprechendes Urteil gefällt, hervorheben, daß ich gerade auf Grund meiner Bearbeitung dieses schwierigen Gebietes die einschlägigen vorzüglichen Arbeiten Kossels sehr hoch schätze und aus ihnen den größten Nutzen gezogen habe. Die „beträchtlichen Irrtümer“, welche mir Kossel zuschreibt, beruhen zum wesentlichen auf Mißverständnissen. Kossel hat mir seinerzeit eine Aufklärung derselben unmöglich gemacht. Es dürfte jetzt nicht mehr lohnen, auf diese sachlich weniger wichtigen Punkte zurückzukommen.

Histons abgespalten; der Rest kann dann entweder aus einem phosphorreicheren Proteid bestehen, was für eine einheitliche Verbindung spräche, oder das Proteid hat den ursprünglichen P-Gehalt, d. h. ein Teil der Nucleinsäure ist zugleich mit dem Histon ausgetreten, was auf eine spezielle Histonverbindung zu beziehen wäre. Aus dem Schwefelgehalte des Restes wären vielleicht auch Aufschlüsse über das Parahiston zu gewinnen. Versuche in dieser Richtung wurden in folgender Art ausgeführt:

Die Lösung des nucleinsauren Histons wurde mit Kochsalz halbgesättigt, filtriert und das Filtrat dialysiert. Nach Entfernung des Kochsalzes bildete sich ein Niederschlag, welcher sich größtenteils in Wasser löste. Diese Lösung fällte ich mit Chlorkalzium und löste den Niederschlag in 2proz. Kochsalzlösung. Weder bei Verdünnung mit Wasser, noch bei Dialyse bildete sich jetzt ein Niederschlag. Auch Zusatz von Chlorkalzium bewirkte jetzt keinen Niederschlag mehr. Dagegen gab Essigsäure eine Fällung, welche 6,27 Proz. P enthielt. Da ich befürchtete, daß die Essigsäure Eiweiß abgespalten hätte, analysierte ich direkt die durch Chlorkalzium erhaltenen Niederschläge ohne weitere Reinigung. Ich erhielt folgende Werte: P 5,48 Proz., Ca 1,85 Proz. und S 0,26 Proz. Die P- und Cawerte blieben unverändert, dagegen ergab sich nur die Hälfte des ursprünglichen S-Gehalts, da das nucleinsaure Histon 5,23 Proz. P, 1,71 Proz. Ca und 0,47 Proz. S enthält.

Die Analysen können nur in der Weise gedeutet werden, daß alles Parahiston und die mit diesem verbundene Nucleinsäure abgespalten, daneben auch ein Teil des eigentlichen nucleinsauren Histons zerlegt worden war, der Rest aber aus eigentlichem nucleinsaurem Histon bestand. Folglich sind sowohl das Parahiston als das Histon jedes für sich mit Nucleinsäure verbunden. Weiter ist hiermit der Beweis geliefert, daß das Parahiston in derselben salzartigen Weise wie das Histon gebunden und die Annahme eines Leukonucleins abzuweisen ist.

Wenn aber die analysierte Verbindung nur Histon und Nucleinsäure enthielt, dann mußte es gelingen, durch Kochsalzsättigung ihrer Lösung alles, was Eiweißreaktionen gibt, auszufällen. Dies war auch der Fall. Im Filtrate fiel die Biuretreaktion vollständig negativ aus.

Wir haben hiermit die erste Frage beantwortet und werden jetzt untersuchen, wie sich die Nucleinsäuren unter den Eiweißbasen verteilen.

Aus dem eigentlichen nucleinsauren Histon stellte ich mir nach der Salzsäuremethode die Nucleinsäure dar. Sie enthielt sowohl Guanin als Adenin. Weiter müßte man die Menge

der Basen bestimmen. Nur wenn man 1 Teil Adenin auf 1 Teil Guanin fände, wäre der Beweis für die oben ausgesprochene Auffassung der Normalsäure endgültig geliefert. Ich habe solche Untersuchungen noch nicht ausgeführt*).

Doch ist nach meinen Beobachtungen über die relativen Mengen des Histons und Parahistons zu erwarten, daß das Histon, welches in größerer Menge als das Parahiston vorkommt, mit jener Nucleinsäure in Verbindung steht, welche in größerer Menge vorkommt. In der Tat kommt die Normalsäure in doppelt so großer Menge vor als die Adenylsäure.

Da wir festgestellt haben, daß sowohl Histon als auch Parahiston mit Nucleinsäure verbunden ist, so ist hiermit auch bewiesen, daß das native nucleinsaure Histon aus zwei Verbindungen besteht. Daraus folgt nicht, daß diese beiden als voneinander unabhängige Verbindungen vorkommen. Eher dürfte das native Histonnucleinat als eine einheitliche Verbindung anzusehen sein, welche den Charakter einer Doppelverbindung, eines Doppelsalzes, besitzt. Denn erstens ist die elementare Zusammensetzung und besonders der Schwefelgehalt in allen Präparaten konstant, folglich in allen dasselbe Mengenverhältnis zwischen Histon und Parahiston gegeben. Weiter haben wir gesehen, daß das eigentliche nucleinsaure Histon eine sehr unbeständige Verbindung ist, welche schon von verdünnten Neutralsalzlösungen erheblich verändert wird, während die ursprüngliche Doppelverbindung sehr beständig ist. Die Gegenwart der Parahistonverbindung ist also von wesentlicher Bedeutung für die Histonverbindung und gibt der ursprünglichen Verbindung ihre Beständigkeit. Zugleich wird sie so selbst vor Zerfall geschützt.

Wir besitzen nunmehr ausreichende Anhaltspunkte zu einer vorläufigen Beurteilung der Konstitution des nucleinsauren Histons, zumal die Spaltungsprodukte sich durch einige spezifische Elemente auszeichnen, die Nucleinsäuren durch ihren P-, die Eiweißkörper durch ihren S-Gehalt, überdies der S-Gehalt der beiden Eiweißkörper untereinander sehr verschieden ist.

5. Die Konstitution des nativen Histonnucleinats.

Aus den schon mitgeteilten Analysen wissen wir, daß das native nucleinsaure Histonkalzium 43,69 Proz. C, 5,60 Proz. H, 16.87 Proz. N, 0,47 Proz. S, 5,23 Proz. P und 1,71 Proz. Ca enthält. Das Histon besteht aus 52,35 Proz. C, 7,50 Proz. H, 18,10 Proz. N, 0,62 Proz. S und das Parahiston aus 51,84 Proz. C, 7,93 Proz. H, 17,73 Proz. N und 2,11 Proz. S. Weiter hat eine

*) Im hiesigen Laboratorium ist die Frage schon in Angriff genommen.

Nucleinsäure, welche aus ²/₃ Normalsäure und ¹/₃ Adenylsäure besteht, eine durchschnittliche Zusammensetzung von 35,49 Proz. C, 3,80 Proz. H, 6,80 Proz. Na, 15,18 Proz. N, 9,17 Proz. P als Na-Salz berechnet, und die freie Säure 38,08 Proz. C, 4,08 Proz. H, 16,18 Proz. N und 9,84 Proz. P.

Da aller Phosphor den Nucleinsäuren angehört, besteht das native nucleinsaure Histon mit 0,47 Proz. S aus 54 Proz. Nucleinsäure und 46 Proz. Eiweißkörper. Diese enthalten daher zusammen 1,02 Proz. S. Wenn weiter das Histon 0,62 Proz. S und das Parahiston 2,11 Proz. S enthalten, bestehen die Eiweißkörper entweder aus 2 Teilen Histon und 1 Teil Parahiston ($^2/_3$ Histon + $^1/_3$ Parahiston = 0,41 Proz. S + 0,70 Proz. S = 1,11 Proz. S), oder aus 3 Teilen Histon auf einen Teil Parahiston ($^3/_4$ Histon + $^1/_4$ Parahiston = 0,47 Proz. S + 0,53 Proz. S = 1,00 Proz. S).

Aus den Analysen des eigentlichen nucleinsauren Histons wissen wir, daß diese Verbindung 5,48 Proz. P und 0,26 Proz. S enthält. Folglich besteht diese aus 56 Proz. Nucleinsäure und 44 Proz. Histon, wenn man vom Phosphor ausgeht und 42 Proz. Histon mit 58 Proz. Nucleinsäure, wenn man den Schwefel zum Ausgangspunkt nimmt. Beide Berechnungen geben somit ein übereinstimmendes Resultat und daraus geht weiter hervor, daß das eigentliche nucleinsaure Histon dieselbe prozentische Zusammensetzung besitzt wie die ursprüngliche Verbindung. (Die kleinen Differenzen liegen innerhalb der Versuchsfehler.) Hieraus läßt sich schließen, daß auch das nucleinsaure Parahiston eine übereinstimmende Zusammensetzung aufweisen muß.

Weitere Aufschlüsse über die Zusammensetzung des nucleinsauren Histons lassen sich hieraus nicht ziehen. Es ist jedoch der proportionalen Menge der Nucleinsäuren nach wahrscheinlich, daß zwei Teile Histon (und nicht drei) auf einen Teil Parahiston kommen, eine Auffassung, deren Richtigkeit ich später noch begründen will.

Das nucleinsaure Histon besteht darnach aus 54 Proz. Nucleinsäure, 30,7 Proz. Histon und 15,3 Proz. Parahiston.

Hiermit ist die Frage nach dem Aufbau des nativen Histonnucleinats in den Hauptzügen gelöst. Wenn ich aber nicht irre, erlauben meine Untersuchungen weitere Schlüsse, und zwar über empirische Formel und Molekulargewicht des Histons und Parahistons, und damit der Eiweißkörper überhaupt. Allerdings hat man schon mehrfach versucht, das Molekulargewicht verschiedener Eiweißkörper zu berechnen, doch muntern die Resultate nicht besonders zur Fortsetzung auf. Im vorliegenden Falle liegen aber die Verhältnisse bedeutend günstiger.

Für das Histon haben wir einen wertvollen Ausgangspunkt im Schwefel.

1. Der Schwefelgehalt des Histons ist 0,62 Proz. Rechnet man ihn wegen der unvermeidlichen Versuchsfehler zu 0,70 bis 0,50 Proz., so können wir das Molekulargewicht auf 4600 (S = 0,70 Proz.) bis 6400 (S = 0,50 Proz.) schätzen.

2. Fürs zweite läßt sich das Molekulargewicht des Histons indirekt aus dem Schwefelgehalt des Parahistons berechnen. Bei einem Gehalt von 2,10 Proz. S hat das Parahiston ein Molekulargewicht von mindestens 1530 [von 1460 — (S = 2,2) bis 1600 — (S = 2,00)]. Ist aber die prozentische Menge des Histons doppelt so groß als jene des Parahistons, so muß man annehmen, daß das Molekulargewicht des Parahistons = 3060, jenes des Histons also 6100 ist, was ganz gut mit der direkten Bestimmung übereinstimmt. Das Parahiston enthält dementsprechend mindestens zwei Atome S. (Es ist ausgeschlossen, daß zwei Moleküle Parahiston vorliegen.)

3. Fürs dritte läßt sich das Molekulargewicht des Histons aus dem eigentlichen nucleinsauren Histon berechnen, da wir jenes der Nucleinsäure kennen. Dieses ist 1272, und folglich ist das des Histons = n. 1010. Dieser Berechnung nach ist das Molekulargewicht des Histons mindestens 5050 bis 6060, woraus folgt, daß das Histon mit mindestens fünf bis sechs Molekülen Nucleinsäure verbunden ist.

4. Weiter habe ich, — worüber später ausführlicher berichtet wird — das Histonchlorid dargestellt und analysiert. Der Chlorgehalt war in drei Analysen 3,64 Proz., 3,33 Proz. und 3,26 Proz. Cl. Hieraus berechnet sich das Molekulargewicht des Histons zu n. 1045 oder mindestens 5225 bis 6270. Die Resultate stimmen also mit der Berechnung aus der Nucleinsäure gut überein.

5. Beim nucleinsauren Histon haben wir folgendes zu berücksichtigen: 1. Das Molekulargewicht des nucleinsauren Histon-Kalziums läßt sich aus dem Kalzium berechnen; 2. enthält diese Verbindung alle drei (vier) Komponenten, was die indirekte Bestimmung der einzelnen und besonders der kompliziertesten erlaubt. Endlich kann man hier den Gehalt an den übrigen Elementen, besonders an Stickstoff, Schwefel und Phosphor miteinander vergleichen und die Verteilung derselben auf die Spaltungsprodukte verfolgen.

Schon in der ersten Mitteilung habe ich eine Formel des nucleinsauren Histons aufgestellt: $(C_{255} H_{390} N_{44} S P_{12} Ca_3 O_{114})$ n. Es kommen darnach drei Moleküle Nucleinsäure auf ein

Atom Schwefel. Da nun sowohl das Histon als das Parahiston Schwefel enthält und das Histon mindestens ein Atom und das Parahiston zwei Atome Schwefel enthalten muß, im nucleinsauren Histon somit mehrere, mindestens drei, Atome S vorhanden sein müssen, so muß die empirische Formel mindestens heißen:

$$C_{765}H_{1170}N_{252}S_3P_{36}Ca_9O_{342}$$

mit einem Molekulargewicht von 20922, einer außerordentlich hohen Zahl, der größten, die man überhaupt aufgestellt hat.

Das nucleinsaure Histon enthält weiter neun Moleküle Nucleinsäure, mit einem Molekulargewicht von 11398. Folglich besteht die Verbindung aus 54,5 Proz. Nucleinsäure und 45,5 Proz. Eiweiß. Die Berechnung aus den empirischen Formeln stimmt also vollständig mit der prozentischen Berechnung überein. Das Histon und Parahiston besitzen dementsprechend zusammen ein Molekulargewicht von 9182 [20922 — (11398 + 360 Ca) + 18 H = 9182], das Histon somit ein Molekulargewicht von etwa **6122** und das Parahiston ein solches von **3060**, eine vollständige Bestätigung der früheren Berechnung. Daraus geht auch hervor, daß meine Auffassung der relativen Menge des Histons und Parahistons die richtige ist. Es würde zu weit führen, wenn ich auseinandersetzen wollte, daß die Annahme eines Verhältnisses von 3 Teilen Histon : 1 Teil Parahiston nicht zutrifft.

6. Nach obigem ist die empirische Formel des nativen nucleinsauren Histons $= C_{765}H_{1188}N_{252}S_3P_{36}O_{342}$, jene der

Nucleinsäuren $= C_{360}H_{498}N_{132} — P_{36}O_{225}$

Die Differenz $= C_{405}H_{690}N_{120}S_3 — O_{117}$

muss die Zusammensetzung des Histons + Parahistons weniger dem bei der Vereinigung aller Komponenten freigewordenen Wasser ergeben. In der Tat, berechnen wir für das Parahiston (Molekulargewicht = 3060) die empirische Formel, so erhalten wir:

$$C_{132}H_{243}N_{39}S_2O_{39}.$$

	Berechnet	Gefunden
C	51,74 Proz.	51,84 Proz.
H	7,93 „	7,93 „
N	17,84 „	17,73 „
S	2,09 „	2,11 „

Es bleibt dann für Histon $C_{273}H_{447}N_{81}S_1O_{78}$ eine Formel, die aber für den Kohlenstoff und Stickstoff zu hohe, für den Sauerstoff und Wasserstoff zu kleine Werte ergibt, (etwa 1 Proz. Diffe-

renz bei allen Elementen), was sich daraus erklärt, daß die Spaltung des nucleinsauren Histons ein hydrolytischer Prozeß ist.

Da wir wissen, daß das Histon mit sechs Molekülen Nucleinsäure verbunden ist, kann man annehmen, daß sechs Moleküle Wasser in das Histon eingetreten sind.

Unter dieser Voraussetzung kommt man zu der empirischen Formel des Histons:

$$C_{273} H_{459} N_{81} S O_{84}.$$

	Berechnet	Gefunden
C	52,46 Proz.	52,35 Proz.
H	7,35 „	7,50 „
N	18,16 „	18,10 „
S	0.51 „	0,62 „

Nach Analogie der Spaltung des eigentlichen nucleinsauren Histons darf man annehmen, daß auch das nucleinsaure Parahiston in derselben Weise zerfällt. Nun enthält, wie schon bemerkt, das nucleinsaure Histon neun Moleküle Nucleinsäure und das eigentliche nucleinsaure Histon sechs, also bleiben drei Moleküle Nucleinsäure für die Parahistonverbindung übrig. Das Parahiston nimmt also bei der Spaltung wahrscheinlich drei Moleküle Wasser auf.

Da aber die für das Parahiston oben aufgestellte Formel mit den analytischen Werten viel besser übereinstimmt als eine Formel mit drei Molekülen Wasser mehr, so darf man wohl annehmen, daß die ursprüngliche Verbindung drei Moleküle H_2O weniger enthält, als wir berechnet haben. Dies macht kaum einen Unterschied in der prozentischen Zusammensetzung aus, wie die nachstehende Berechnung (für die Kalziumverbindung) zeigt:

	C	H	N	S	P	Ca
Berechnet	43,51	5,58	16,91	0,47	5,35	1,73
Gefunden	43,69	5,60	16,87	0,47	5,23	1,17

Sämtliche aus der Atom-, wie aus der Prozentberechnung sich ergebenden Werte stimmen somit sehr gut überein. Davon haben selbstverständlich die Werte des N, S, P und Ca die größte Bedeutung. Daß auch C und H ganz und gar übereinstimmen, ist mehr als ein Zufall anzusehen.

7. Daß sich aus der Differenz der Nucleinsäuren drei Moleküle Nucleinsäure für die Parahistonverbindung ergeben haben, verdient hervorgehoben zu werden. In Übereinstimmung mit den

früheren Angaben, betreffend die zwei Nucleinsäuren, haben wir hier zwei Teile Normalsäure und einen Teil Adenylsäure, die erstere mit dem Histon, die letztere mit dem Parahiston verbunden. Weiter ergeben drei Moleküle Adenylsäure zu 1250 zusammen ein Molekulargewicht von 3750, während das Molekulargewicht des Parahistons = 3060 ist. Das nucleinsaure Parahiston besteht danach aus 44,9 Proz. Parahiston und 55,1 Proz. Adenylsäure.

8. Aus den Arbeiten Kossels und Kutschers haben wir die approximativen Werte der Spaltungsprodukte des Thymushistons kennen gelernt. Von den Diaminosäuren sind drei bestimmt, von den Monaminosäuren nur Tyrosin und Glutaminsäure. Es hat einiges Interesse, zu untersuchen, wie sich die Sache verhält, wenn man diese prozentischen Werte in Moleküle umrechnet.

	Mol.-Gew. = 6245		N = 81	
	Berechnet	Gefunden	Berechnet	Gefunden
6 Mol. Arginin . .	16,71 Proz.	14,36 Proz.	29,96 Proz.	25,17 Proz.
4 „ Lysin . .	9,36 „	7,70 „	9,89 „	8,04 „
1 „ Histidin . .	2,35 „	1,21 „	3,70 „	1,79 „
6 „ Ammoniak .	1,63 „	1,66 „	7,41 „	7,46 „
3 „ Tyrosin . .	8,70 „	6,31 „	3,70 „	2,67 „
2 „ Glutaminsäure	4,70 „	3,66 „	2,47 „	1,90 „

Die Resultate stimmen genügend überein, wenn man sich erinnert, daß die gefundenen prozentischen Werte nur einen annähernden Wert besitzen. Kossel und Steudel bemerken z. B. in der letzten Publikation über Hexonbasen, daß die angewandte Methode zur Bestimmung des Histidins einer Verbesserung bedürftig sei, und haben nach einer solchen bei Edestin auch 2,20 Proz. Histidin gegen 1,16 Proz. von Schulze und Winterstein und 1,1 Proz. von Abderhalden gefunden. Dasselbe ist auch mit den übrigen Basen, z. B. dem Lysin der Fall. (Deswegen habe ich auch einen Gehalt von vier Molekülen und nicht drei, welche 7,02 Proz. entsprächen, angenommen.) Daß die Werte für Tyrosin zu klein erhalten werden, ist nach der Art der Bestimmung zu erwarten.

Von den 81 Stickstoffatomen des Histons haben wir also etwa die Hälfte (46 Atome) in diesen Spaltungsprodukten wiedergefunden. Aller Wahrscheinlichkeit nach finden sich die übrigen als Monaminosäuren, und in erster Reihe dürften wir an Leucin denken, dessen Menge noch nicht bestimmt ist.

Das Parahiston enthält 39 Atome N. Etwa 12 Proz. davon oder fünf bis sechs Atome finden sich in den Diaminosäuren.

Das Parahiston kann somit *nicht* alle drei Hexonbasen enthalten. (1 Molekül Arginin + 1 Molekül Lysin = 6 Atome N, 1 Molekül Histidin + 1 Molekül Lysin = 5 Atome N.) Wir haben somit hier anscheinend einen Eiweißkörper, der *nicht* alle drei Hexonbasen enthält.

Die Spaltung des nucleinsauren Histons läßt sich nach dem Gesagten vorläufig in folgender Weise ausdrücken: $C_{765} H_{1182} N_{252} S_3 P_{36} O_{339} + 9 H_2O = C_{132} H_{243} N_{39} S_2 O_{39} + C_{278} H_{459} N_{81} S O_{84} + 6(C_{40} H_{56} N_{14} P_4 O_{26}) + 3(C_{40} H_{54} N_{16} P_4 O_{23})$.

Auf Grund der angeführten acht Beweisgründe kann das Molekulargewicht des Histons nicht gut *kleiner* gedacht werden, aber es bleibt noch zu erörtern, ob es nicht in der Tat ein *viel größeres* ist.

Dabei müssen wir zunächst an die Bindung des Schwefels denken. Enthält das nucleinsaure Histon *bleischwärzenden* Schwefel, so muß man eine *Cystin*gruppe mit zwei Atomen S im Molekül annehmen, und das Molekulargewicht ist zu verdoppeln.

Die Untersuchung des nucleinsauren Histons auf bleischwärzenden Schwefel gab aber ein sehr zweifelhaftes Resultat. Beim Kochen mit $NaOH + Pb (C_2H_3O_2)_2$ konnte ich *keine* Schwärzung beobachten, doch wurde die Lösung etwas dunkler und setzte nach Stunden einen schwach bräunlichen Bodensatz ab. Wenn ich aber mit Alkali allein kochte, konnte ich auch eine Farbenveränderung beobachten und ebenso einen schwach gefärbten Bodensatz. In ganz derselben Weise verhielt sich das Histon selbst. Ich bin deswegen betreffs der Existenz des Cystins in Zweifel. Da aber der Nachweis kleiner Cystinmengen sehr schwierig sein kann und man in anderen Histonen Cystin in geringer Menge gefunden hat, so ist damit das Vorkommen des Cystins nicht ausgeschlossen. *Malengreau* sagt allerdings, daß sein B-Histon (also aus dem nucleinsauren Histon dargestellt) *keinen* bleischwärzenden Schwefel enthält, und dasselbe habe ich in meiner in norwegischer Sprache erschienenen Arbeit mitgeteilt, bevor ich noch den Schwefel bestimmt hatte. Dagegen kann ich mit Bestimmtheit sagen, daß das Parahiston nicht bleischwärzenden Schwefel enthält, trotzdem es zwei Atome S besitzt.

Erst eine genauere Untersuchung dieses Problems kann uns über die absolute Größe des Histonmoleküls genaueren Aufschluß geben. Auch die Untersuchung der Diaminosäuren des Parahistons wird hierzu wichtige Beiträge liefern. Enthält das Parahiston drei Basen, dann muß sein Molekül verdoppelt werden, vorausgesetzt, daß etwa 12 Proz. davon vorliegen. —

6. Kommt das nucleinsaure Histon als solches in der Thymuszelle vor, oder wird es erst bei der Darstellung gebildet?

Unsere Vorstellungen über die Art, in der die Nucleoproteide in der Zelle und besonders in dem Zellenkerne gebunden sind, müssen derzeit als recht unbestimmt bezeichnet werden. Was die Thymus betrifft, hat man die Auffassung verfochten, daß die saure und basische Komponente überhaupt erst bei der Auflösung der

Zelle zu einer Verbindung, dem Nucleohiston, zusammentreten. Ich finde diese Auffassung nicht genügend begründet, selbst wenn man anstatt Nucleohiston nucleinsaures Histon sagte. Zwar haben wir hier Säure und Base, welche beide als getrennte Bestandteile der Zelle gedacht werden können, doch bin ich der Meinung, daß das native nucleinsaure Histon als solches in der Zelle vorgebildet ist und nicht erst bei der Extraktion entsteht, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Bei einer anderen Art Zellen, jenen des Pankreas, ist höchst wahrscheinlich das wichtigste Nucleoproteid, Hammarstens α-Proteid, in der Zelle vorgebildet. Denn die Guanylsäure dieses Proteides verbindet sich nicht spontan mit Eiweiß.

2. Das native nucleinsaure Histon hat eine konstante Zusammensetzung, die einem Hexa-Normalsäure-Histon + Tri-Adenylsäure-Parahiston entspricht. Wenn einmal diese vier Körper getrennt aus der Thymus hervorgegangen sind, so ist es höchst unwahrscheinlich, daß sie sich genau auf dieselbe Weise wieder verbinden.

3. Die Eigenschaften dieser Verbindung sprechen entschieden gegen eine solche Auffassung. Einmal gespalten, lassen sich die Komponenten nicht ohne weiteres zu nucleinsaurem Histon regenerieren. Es wäre auch sehr auffällig, wenn die Thymus alle Komponenten in ganz proportionaler Menge enthielte, falls diese in der Zelle nichts miteinander zu tun hätten.

Ich glaube also, daß das nucleinsaure Histon als solches in der Thymuszelle vorkommt. Es fragt sich dann weiter, ist das native, nucleinsaure Histon eine primäre Verbindung oder kommt es darin in einer noch komplizierteren Verbindung vor. (Daß es eine denaturierte Verbindung nicht ist, d. h., daß es keine Umlagerung der Moleküle oder Atome erfahren hat, darüber kann man wohl nicht im Zweifel sein.)

Nun spricht manches dafür, daß das nucleinsaure Histon als eine komplizierte Verbindung in der Zelle vorkommt und daß wir in ihm trotz seines hohen Molekulargewichtes nur einen Bruchteil der primären Verbindung vor uns haben.

Ich habe bereits in der ersten Mitteilung erwähnt, daß das native nucleinsaure Histon nur nach längerer Einwirkung von Wasser und nach vollständiger Auflösung der Zellen als Alkalisalz in Lösung geht. Das Wasser zerlegt allmählich die kompliziertere Verbindung und macht das nucleinsaure Histon-Alkali frei. Physiologische Kochsalzlösung tut dies nicht, trotzdem das nucleinsaure Histon darin jedenfalls zum Teil löslich ist; man findet aber keine Spur der Verbindung im Kochsalzextrakte.

Man kann diese Tatsache kaum anders deuten, als daß das Histon-Parahistonnucleinat noch mit anderen Bestandteilen der Zelle verbunden ist, und daß das Wasser diese Verbindungen zerlegt, weil das native nucleinsaure Histon-Alkali zum Wasser die größere Affinität besitzt. Dagegen bleibt die Zelle unverändert (von dem Nucleoproteide abgesehen), wenn man sie mit 0,9 proz. NaCl-Lösung zusammenbringt, da das native nucleinsaure Histon-Alkali zu Kochsalz viel geringere Affinität besitzt als zu anderen Zellbestandteilen. Daß das nucleinsaure Histon-Alkali eine solche Bedeutung besitzt, läßt sich auch anderweitig zeigen. In den Lymphdrüsen kommt ein nucleinsaures Histon-Alkali vor, welches in 0,9proz. Kochsalzlösung leicht löslich ist. Behandelt man damit isolierte Lymphdrüsenzellen einige Zeit, so kann man beobachten, daß sich dabei viele — nicht alle — auflösen*).

Die Vorstellung, daß das Nucleinat der Thymusdrüse andere Komplexe bindet, gewissermaßen zusammenhält, wird dadurch gestützt, daß es hier in sehr reichlicher Menge vorkommt. Mindestens 20 Proz. des Eiweißgehaltes entfallen auf diese Verbindung. Und wir wissen weiter, daß das nucleinsaure Protamin (und das nucleinsaure Histon) im Fischsperma beinahe die einzige Eiweißverbindung darstellt, woraus hervorgeht, daß das Nucleinat eine dominierende Rolle in der Zelle spielen kann.

Es verdient auch erwähnt zu werden, daß ein Zusatz von Nucleinat zum Wasser seine auflösende Wirkung auf Thymuszellen herabsetzt.

Im Hinblick auf dieses Verhalten ist es von Interesse, zu wissen, auf welche Weise sich etwa andere Zellbestandteile, besonders die Eiweißkörper an das Nucleinat anlagern, „verankern“ können.

In meiner ersten Mitteilung habe ich erwähnt, daß das nucleinsaure Histon-Alkali deutlich sauer reagiert. Diese saure Reaktion ist selbstverständlich von den Nucleinsäuren und nicht von den Basen bedingt. Weiter wissen wir, daß eine neutrale Lösung des nucleinsauren Alkalis mit Eiweiß einen Niederschlag gibt, wenn man Essigsäure hinzufügt. Endlich habe ich gezeigt, daß sich neutrales nucleinsaures Alkali mit Essigsäure zu einem sauren Salz umsetzt (welches mit Ammonsulfat ausgesalzen werden kann).

Die Nucleinsäure schlägt also Eiweißkörper als Nucleinsäureverbindungen nieder, wenn einige ihrer

*) Auf der andern Seite kennt man auch Zellen, welche gegen destilliertes Wasser resistent sind.

sauren Valenzen freigemacht werden, und dies ist eben beim nucleinsauren Histon-Alkali der Fall. Wie ich zeigen will, ist von den vier Valenzen der Nucleinsäure dann nur eine frei, während man beim Zusatz von Essigsäure mehrere, ja alle Valenzen freimachen kann. Dabei kann das Vorhandensein des Histons usw. eine Rolle spielen. —

Auf der anderen Seite ist es bekannt, daß auch das Histon (und teilweise das Parahiston) mit Eiweiß unlösliche Verbindungen eingehen kann. Es fragt sich daher, ob auch diese Wirkung des Histons im Nucleinate zur Geltung kommt.

Um dies genauer festzustellen, war es notwendig, andere Histonsalze darzustellen und zu untersuchen. Das unlösliche freie Histon brauchte nicht berücksichtigt zu werden.

Von Salzen des Histons stellte ich das Chlorid dar.

Das Nucleinat wurde mit Salzsäure gespalten, das Chlorid mit Alkohol und Äther niedergeschlagen, in Wasser gelöst, dialysiert und aufs neue mit Alkoholäther gefällt (das Parahiston läßt sich so nicht fällen) und getrocknet. Das Chlorid war aschefrei, im Wasser leicht löslich und reagierte deutlich sauer. Die Präparate wurden bei 100° C getrocknet und waren auch nachher vollkommen und leicht in Wasser löslich, und die Lösung reagierte immer sauer. Nachdem konstantes Gewicht erreicht worden war, standen die Präparate noch drei Tage im Trockenschrank. Es trat keine Änderung der Löslichkeit, Reaktion und Zusammensetzung ein.

Das Histon bildet also mit der Salzsäure ein sauer reagierendes Salz. Die Salzsäure ist hier höchst wahrscheinlich auf zweierlei Weise gebunden: Sie bildet

1. ein neutrales Chlorid. Dafür spricht die Tatsache, daß, wenn man die saure Lösung neutralisiert, das neutrale Histonchlorid gelöst bleibt.

2. Dieses neutrale Salz addiert freie Salzsäure und hält diese Salzsäure so fest, daß sie sich beim Trocknen nicht verflüchtigt.

Das Histon besitzt dementsprechend zwei verschiedene Valenzen. Die eine Valenz will ich als Hauptvalenz, die zweite als Nebenvalenz bezeichnen. Ähnliche Verhältnisse sind bei den organischen Basen nicht unbekannt.

Es fragt sich weiter, wieviele Haupt- und Nebenvalenzen das Histon besitzt. Wie schon früher bemerkt, enthält das Histonchlorid sechs Atome Cl, und ich kann hinzufügen: Sämtliche sechs Atome Cl sind in der neutralen Histonverbindung gebunden. Bei der Untersuchung des sauren Salzes habe ich weiter gefunden, daß dieses dreizehn Atome Cl enthält. (Gefunden: 7,1 Proz., 7,4 Proz., 7,1 Proz. Cl.) Das Histon be-

sitzt daher sechs Hauptvalenzen und sieben Nebenvalenzen.

Welche von diesen Valenzen bedingen die Reaktionen des Histons? Wenn sich z. B. das Histon mit Eiweiß verbindet und als unlösliche Histon-Eiweißverbindung ausfällt, sind dann die Haupt- oder Nebenvalenzen mit dem Eiweiß verankert? Die Frage läßt sich experimentell untersuchen.

Von Präparaten des sauren Histonchlorids wurden Proben in Wasser gelöst. Als Eiweißlösung diente eine konzentrierte Lösung von zweimal umkristallisiertem Ovalbumin. Es zeigte sich dann, daß das saure Chlorid absolut keine eiweißfällende Wirkung besitzt. Wenn man aber zuerst die Histonchloridlösung neutralisiert, bildet sich sofort ein Niederschlag. Daß nicht die saure Reaktion als solche die Fällung hindert, läßt sich so zeigen, daß man erst die Lösungen von Histonchlorid und Eiweiß mischt und dann neutralisiert: Schon bei der Abstumpfung der sauren Reaktion wird die Lösung undurchsichtig opaleszent.

Es geht aus diesen Versuchen bestimmt hervor, daß die Nebenvalenzen des Histons die eiweißfällende Wirkung desselben bedingen. Werden die Nebenvalenzen von einer Säure in Anspruch genommen, so ist die eiweißfällende Wirkung aufgehoben: die betreffenden Affinitäten sind schon gesättigt. Daß man bei der Neutralisation diese Affinitäten wieder freimachen kann, ist dahin zu verstehen, daß das Alkali den Nebenvalenzen die Salzsäure wieder entreißt.

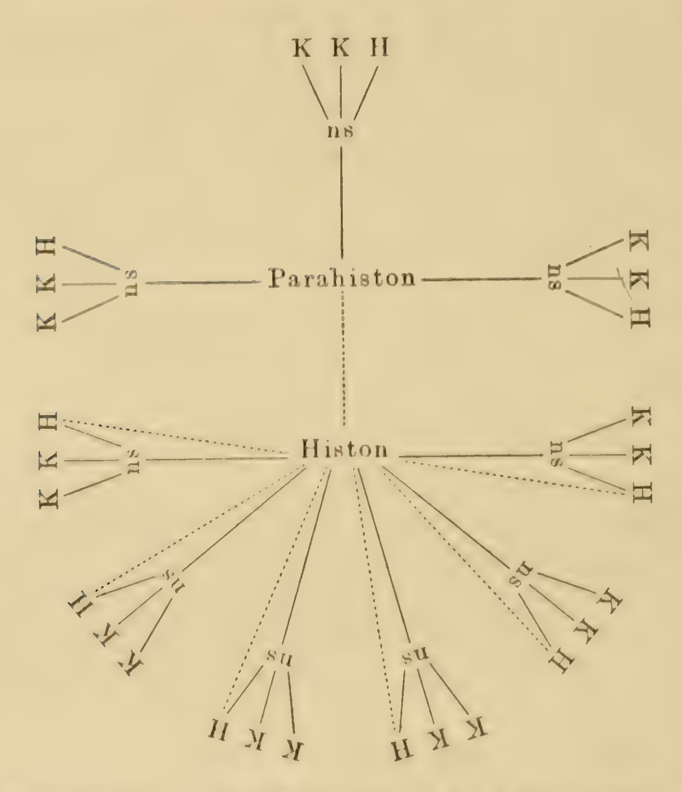
Wir haben nun alle Daten zur Aufstellung einer vorläufigen rationellen Formel:

Die Nucleinsäuren besitzen vier Valenzen. Das Histon besitzt sechs Haupt- und sieben Nebenvalenzen, sechs Moleküle Nucleinsäure kommen auf ein Molekül Histon. Wir können ferner mit aller Wahrscheinlichkeit annehmen, daß das Parahiston so gebunden ist wie das Histon, und daß drei Moleküle Nucleinsäure auf ein Molekül Parahiston kommen.

Endlich wissen wir, daß im Histon-Alkalinucleinate zwei Atome Alkali (ein Atom Kalzium) auf eine Nucleinsäure entfallen. Somit sind von den vier Valenzen der Nucleinsäure zwei Valenzen vom Alkali, eine Valenz vom Histon mit Beschlag belegt, nur eine Valenz ist dann noch verfügbar. Diese entspricht den Nebenvalenzen des Histons und bedingt zugleich die saure Reaktion des nucleinsauren Histons. Von allen sauren und basischen Affinitäten bleibt also nur eine Nebenvalenz des Histons, die siebente, übrig; diese ist frei; sie kann sich folglich mit Eiweiß verbinden. Dies ist auch in der Tat der Fall. Durch diese letzte Valenz des Histons wird das eigentliche

nucleinsaure Histon mit dem Parahistonnucleinate verbunden.

Der Übersichtlichkeit wegen habe ich diese Tatsachen graphisch dargestellt. Bekanntlich enthalten die Zellen viel Kali, und wenn das Nucleinat bei der Wasserextraktion als Alkaliverbindung in Lösung geht, geschieht dies höchst wahrscheinlich als Kalisalz.



ns = Nucleinsäure, die punktierten Linien deuten die Nebenvalenzen des Histons an.

Für das Parahiston habe ich keine Nebenvalenzen angeführt, obwohl das neutrale Parahistonsulfat auch Eiweiß fällen kann. Doch tritt diese Wirkung viel weniger hervor als beim Histon.

Diese graphische Darstellung soll eine vorläufige Vorstellung von der vermutlichen Konstitution des nativen nucleinsauren Histons vermitteln. Sie zeigt, daß die ungesättigten Affinitäten ausschließlich der vierten Valenz der Nucleinsäuren entsprechen. Wenn nun auch diese Affinitäten teilweise durch Histon gesättigt werden können, so kann die Verankerung anderer Eiweißkörper begreiflicherweise doch nur eine labile sein.

Es ließe sich aber noch denken, daß auch die Histonwirkung zur Geltung kommen kann. Wird nämlich die vierte Valenz der Nucleinsäure von den Eiweißkörpern besetzt, so werden die Nebenvalenzen des Histons wieder frei und können sich ihrerseits mit Eiweiß verbinden. Wird aber die Nucleinsäurebindung wieder aufgehoben, so kann auch die Histonwirkung nicht mehr bestehen.

Die Verankerung durch die Nucleinsäuren wird nun selbstverständlich aufgehoben, sobald Körper vorhanden sind, zu welchen entweder die Nucleinsäure oder das Eiweiß größere Affinität haben als zueinander. Ein solcher Körper ist Wasser. Behandelt man Thymuszellen mit Wasser, so geht, wie bereits erwähnt, das Nucleinat erst in Lösung, wenn die Zelle aufgelöst worden ist, und diese Auflösung geht langsam von statten, und zwar in dem Verhältnis, als die Affinitäten sich umsetzen. Ist diese Umsetzung erfolgt, so haben wir in der Lösung das nucleinsaure Histon mit der freigemachten vierten Affinität. Diese Auflösung läßt sich verhindern, wenn man dem Wasser eine Substanz zusetzt, welche die Affinität des Nucleinates zum Wasser herabsetzt. Solche Substanzen sind Kochsalz und das Nucleinat selbst. In 0,9proz. Kochsalzlösung ist das Nucleinat wenig löslich, und die Anwesenheit des nucleinsauren Histon-Alkalis wird selbstverständlich die Dissoziation der Nucleinatverbindung zurückdrängen.

Die Auffassung, die ich hier entwickelt habe, scheint mir die bekannten Tatsachen am besten zu erklären. Ich habe aber außerdem noch zwei Tatsachen mitzuteilen, welche nicht ohne Interesse sind.

Wie schon früher gezeigt worden ist, ist das eigentliche nucleinsaure Histon im Wasser schwer löslich. Auch geben Lösungen von Histonchlorid und nucleinsaurem Alkali einen Niederschlag von nucleinsaurem Histon. Vergleicht man hiermit die anderen Histonsalze, so erhält man der Löslichkeit nach folgende Reihe:

1. Saures Histonchlorid, in Wasser und 70proz. Alkohol leicht löslich. Wird nur von Alkoholäther ausgefällt.

2. Histonsulfat, in Wasser leicht löslich, in 70proz. Alkohol unlöslich.

3. Histonphosphat, in Wasser weniger leicht löslich. Saures Histonchlorid in konzentrierter Lösung gibt mit einer neutralisierten Orthophosphorsäurelösung eine deutliche Trübung und später Fällung.

4. Histonnucleinat, in Wasser schwer löslich.

Die Histonsalze der einwertigen Säuren sind also leicht löslich. (Das Nitrat verhält sich wie das Chlorid.) Die der zweibasischen Säuren sind weniger leicht als die der einbasischen und leichter als die der dreibasischen löslich. Diese sind aber immer noch leichter löslich als die Salze der vierbasischen Nucleinsäure.

Wenn das nucleinsaure Histon-Alkali von 0,9 proz. NaCl-Lösung gefällt wird und sich in konzentrierterer NaCl-Lösung wieder löst, so läßt sich dieses Verhalten nicht gut aus physikalisch-chemischen Gesetzen verstehen. Wenn das Histon-Alkalinucleinat von 0,9 proz. NaCl-Lösung ausgefällt wird, kann man zwar annehmen, daß das Nucleinat in der Lösung dissoziiert ist. Ein Zusatz von Kochsalz drängt die Dissoziation zurück, und die nicht dissoziierte Verbindung wird ausgefällt. Wenn man aber mehr Kochsalz zusetzt, dann dürfte die Dissoziation nicht größer, eher geringer werden, und doch geht das Nucleinat wieder in Lösung!

Wir stehen hier vor einer neuen und doch schon bekannten Tatsache. Ich habe nämlich schon früher bezüglich der Histon-Eiweißverbindung bzw. Parahiston-Eiweißverbindung mitgeteilt, daß diese Niederschläge in konzentrierterer Kochsalzlösung löslich sind, und wir wissen nun, daß das Histon hier in ganz derselben Weise an Eiweiß gebunden ist, wie in dem nativen Histon-Parahistonnucleinat an das Parahiston.

Wir stehen hier vor Tatsachen, die einen weiteren Einblick in die Konstitution, die Reaktionen und Spaltungen des Nucleinats erlauben. Ich verzichte hier auf eine weitere Diskussion, da eine solche zweckmäßig mit einer experimentellen Prüfung Hand in Hand gehen müßte, die zurzeit noch fehlt.

Der komplizierte Bau und die eigentümlichen Affinitätsverhältnisse des Histon-Parahistonnucleinates gestatten es sonach, anzunehmen, daß es bereits in der Zelle mit Eiweiß und vielleicht auch anderen Zellbestandteilen mehr oder weniger fest verbunden und so an dem Aufbau der lebenden Substanz in hervorragender Weise beteiligt ist.

Faßt man das Zellprotoplasma als ein einziges gewaltiges Molekül auf, so liegt es nahe, dem Nucleinat gewissermaßen eine zentrale Stellung darin zuzuschreiben.

7. Über die Zusammensetzung der Thymuszellen.

Es war weiter von Interesse, zu untersuchen, in welcher Beziehung der Menge nach die beschriebenen beiden Nucleoproteide zu den übrigen Bestandteilen der Zelle stehen.

Quantitative Bestimmungen an der Thymuszelle sind schon von Lilienfeld ausgeführt worden, und ein Vergleich mit seinen Zahlen hat schon darum ein gewisses Interesse, da man so erfahren kann, wieviel von seinem Nucleohiston eigentlich aus nucleinsaurem Histon bestand.

Bekanntlich hat Lilienfeld 98 Proz. alles Eiweißes in Form von Nucleohiston gefunden. Ich selbst habe nicht Thymus direkt untersucht, sondern einen Brei von Thymuszellen dargestellt und analysiert. Zum Vergleich habe ich Lilienfelds Werte auf feuchte Substanz umgerechnet.

	Lilienfeld		Bang
Wasser	88,51 Proz.		80,41 Proz.
Feste Stoffe davon	11,49 „		19,59 „
Eiweißkörper usw. davon	9,10 „		15,52 „
Nucleohiston	8,90 „	Nucleinsaures Histon-Parahiston	3,15 „
		Nucleoproteid	1,08 „
Alkohollösliche Stoffe	1,83 „		2,48 „
Asche	—		1,59 „

Es zeigt sich somit, daß 20 Proz. der Eiweißkörper (Minimalwert!) aus nucleinsaurem Histon-Parahiston und 7 Proz. aus Nucleoproteid bestehen. 73 Proz. entfallen auf unbekannte Substanzen, und von diesen sind nur geringe Spuren genuine Eiweißkörper, Albumin und Globulin. Weiter sieht man, daß höchstens 30 Proz. des Nucleohistons aus nucleinsaurem Histon besteht. Beinahe 60 bis 70 Proz. dieser Verbindung bestehen aus Substanzen, welche nichts damit zu tun haben. (Es kann daher nicht befremden, daß der größte Teil des Chlorkalziumniederschlages nach der Extraktion mit 2proz. Kochsalzlösung ungelöst auf dem Filter geblieben ist.)

Noch größeres Interesse als die prozentische Verteilung der festen Stoffe hat nach meiner Ansicht die Verteilung des Phosphors. Ich habe deswegen bestimmt: 1. den totalen Phosphorgehalt der getrockneten Thymuszellen, 2. den Phosphorgehalt der Eiweißkörper usw. (Der P-Gehalt des nucleinsauren Histon-Parahistons und Nucleoproteides ist bereits oben bestimmt.)

Feste Stoffe	19,59 Proz.	2,77 Proz. P	0,543 Proz. P
Eiweißkörper usw.	15,52 „	2,88 „ „	0,450 „ „
Nucleinsaures Histon-Parahiston	3,15 „	5,35 „ „	0,170 „ „
Nucleoproteid	1,08 „	1,00 „ „	0,010 „ „

Von dem gesamten Phosphor finden sich somit 17 Proz. in den alkohollöslichen Substanzen, 31 Proz. im nucleinsauren Histon-Parahiston, 2 Proz. im Nucleoproteid, der Rest von 49 Proz., die Hälfte der Gesamtmenge, gehört noch unbekannten Substanzen

an. Nur ein Teil davon dürfte in anorganischer Form vorliegen. Vielleicht sind somit noch unbekannte wichtige Nucleoproteide oder phosphorhaltige Eiweißverbindungen vorhanden.

8. Physiologische Untersuchung der Nucleoproteide der Thymus.

Bekanntlich schreiben Lilienfeld, Huiskamp u. a. dem Nucleohiston wichtige physiologische Funktionen zu. Besonders soll es eine wichtige Rolle bei der Koagulation des Blutes spielen. Ich habe deswegen meine zwei Nucleoproteide auf deren physiologische Wirkungen in verschiedener Richtung untersucht.

Nach Lilienfeld hat das Nucleohiston in vitro und in vivo ausgesprochene koagulierende Wirkung auf Plasma-, Blut- und Fibrinogenlösungen.

Versetzt man aber Plasma oder eine nach Hammarsten dargestellte Fibrinogenlösung mit einer Lösung des Nucleoproteides, so tritt keine Koagulation ein. Dagegen bewirkt in Fibrinogenlösungen ein nachfolgender Zusatz von Kalziumchlorid Gerinnung. Daß aber diese Gerinnung nichts mit der normalen Koagulation des Blutes zu tun hat, beweist die Tatsache, daß die Nucleoproteidlösung keine Gerinnung bewirkt, wenn man sie mit Chlorkalzium aktiviert und nachher das Chlorkalzium wieder entfernt. Einspritzung des Nucleoproteides beim Kaninchen hat keine intravaskuläre Gerinnung zur Folge. Auch bewirkt eine Nucleoproteideinspritzung keine Änderung der normalen Koagulationszeit.

Das Nucleoproteid hat also nichts mit dem Fibrinfermente zu tun.

Dagegen werden 0,9proz. Kochsalzextrakte durch Digestion bei 38° autolysiert, wie es Kutscher beschrieben hat.

Das nucleinsaure Histon-Parahiston hat überhaupt keine Koagulationswirkung, sei es in vitro oder in vivo. Man kann auch beliebige Mengen davon Kaninchen einspritzen, ohne Giftwirkung wahrzunehmen. In dieser Beziehung ist also das Nucleinat von dem Chloride verschieden, insofern dieses eine ausgesprochen antikoagulierende Wirkung besitzt. Das Vorkommen freier Nebenvalenzen ist hier also entscheidend.

Versuch I. In die Vena jugularis eines mittelschweren Kaninchens wurden 15 ccm einer 1,5proz. Lösung eingespritzt. Die normale Koagulationszeit war 5,30 Minuten. Drei Minuten nach der Einspritzung koagulierte eine entnommene Blutprobe momentan. Das Tier verblieb ganz gesund. Keine Albuminurie oder Glykosurie.

Versuch II. Kaninchen 2700 g schwer; das Blut aus der Jugularis koagulierte nach vier Minuten. Drei Proben zu je 3 ccm wurden versetzt:

1. mit 1 ccm 2proz. Kochsalzlösung, 2. mit 1 ccm einer 4,66proz. Histonnucleinatlösung und 3. mit 1 ccm einer Nucleinsäurelösung. Die Koagulationszeiten waren für: 1. $3^1/_2$ Min., 2. $3^1/_2$ Min. und 3. $3^1/_2$ Min. Danach wurden 10 ccm einer Histonnucleinatlösung von 4,66 Proz. = 0,18 g pro kg injiziert. Keine Änderung des Zustandes. Zwei Min. nach der Injektion wurde eine Blutprobe ausgenommen, welche nach $3^1/_2$ Min. koagulierte. Das Tier blieb gesund.

Das nucleinsaure Histon-Alkali ist gegen Fäulnis sehr widerstandsfähig. Eine solche Lösung zeigte nach acht Tagen im Digestionsapparat keine Spur von Fäulnis. Dagegen war eine Veränderung eingetreten, derart, daß Chlorkalzium keinen Niederschlag mehr bewirkte, wohl aber Essigsäure. Es handelte sich vielleicht um Autolyse.

Endlich habe ich bemerkt, daß das nucleinsaure Histon-Alkali einigermaßen die Auflösung der Thymuszellen durch Wasser verhindert oder verzögert, was mit meiner Auffassung von der Bedeutung desselben für die Zelle im Einklang steht.

Versuch: Thymuszellenbrei wurde durch Schütteln mit Wasser emulgiert und die Flüssigkeit in zwei Portionen geteilt. Die eine versetzte ich mit $^1/_{10}$ Vol. Wasser, die andere mit demselben Volum Histonnucleinatlösung. Nach fünf Stunden waren in der ersten Probe die Zellen zu einem schleimigen Klumpen zusammengeflossen, in der zweiten waren die Zellen unverändert. Der Kochsalzgehalt war in beiden Proben derselbe (0,08 Proz.).

XXIX.

Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe.

Von **Ivar Bang.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium zu Lund, Schweden.)

Dritte Mitteilung.

Über das Vorkommen von Nucleoproteiden in Lymphdrüsen, Knochenmark, Milz, weißen Blutkörperchen und Sarkomen.

1. Die Lymphdrüsen.

Die Vorstellungen, die man sich über die Nucleoproteide der Lymphdrüsen gemacht hat, beruhen hauptsächlich auf den Arbeiten A. Schmidts und Lilienfelds.

Nach A. Schmidt kann man aus den mit Alkohol erschöpften Drüsen durch Wasser eine Proteinsubstanz, das Cytoglobin, extrahieren, welches 4,5 Proz. P enthält. Diese Substanz könnte darnach als ein nucleinsaures Histon aufgefaßt werden, wenn nicht ein hoher Schwefelgehalt dies unwahrscheinlich machte. Noch mehr tun dies die Spaltungsprodukte des Cytoglobins. Bei der Behandlung mit Essigsäure wurde nämlich aus dem Cytoglobin ein Präglobulin mit nur 3,7 Proz. P abgespalten, während man bei der Einwirkung von Essigsäure auf Nucleinate immer phosphorreichere Substanzen erhält. Merkwürdigerweise soll von diesem Präglobulin das Serumglobulin herstammen.

Nach Lilienfeld enthalten die Lympdrüsenzellen dasselbe Nucleohiston wie die Thymus.

Bei meinen Untersuchungen der Lymphdrüsen war die Methodik schon gegeben.

Wie bei der Thymus benutzte ich eine kombinierte Extraktion mit 0,9proz. Kochsalzlösung und destilliertem Wasser. Das Kochsalzextrakt ist nach Zentrifugierung und Filtration eine undurchsichtige, braungefärbte, amphoter reagierende Lösung, welche nicht von Chlorkalzium gefällt wird. Dagegen gibt Essigsäure einen reichlichen Niederschlag.

Bei der Extraktion mit Wasser bemerkt man im Gegensatz zur Thymus, daß hier keine Schleimbildung vorkommt. Schon nach einigen

Minuten geben sowohl Essigsäure als Chlorkalzium Niederschläge, während man im Thymusextrakte erst nach 24 Stunden mit Chlorkalzium Fällung bekommt. Im Filtrate des Chlorkalziumniederschlages gibt auch hier Essigsäure eine Nachfällung. Andererseits kann man nach der Extraktion mittels 0,9proz. Kochsalzlösung mit Wasser eine Substanz ausziehen, welche von Chlorkalzium niedergeschlagen wird. Dieser Niederschlag wurde auf nucleinsaures Histon nach der Alkoholmethode verarbeitet, und zwar mit positivem Resultate. Ich konnte zuletzt mit 2proz. Kochsalzlösung eine Substanz extrahieren, welche bei Sättigung mit Kochsalz usw. in Histon, Parahiston und Nucleinsäure zerlegt werden konnte. Die Existenz des nucleinsauren Histons war hierdurch sehr wahrscheinlich gemacht; als ich aber zur Darstellung des Nucleinats überging, zeigte sich sogleich ein nicht unerheblicher Unterschied:

Nach Verdünnung mit Wasser bis zu 0,8 bis 1 Proz. Kochsalz blieb die Lösung vollständig klar. Nach der Dialyse vermißte ich jeden Niederschlag. Auch nach der Verdünnung des 2proz. NaCl-Extraktes mit Wasser bewirkte Chlorkalzium keine Fällung, doch wurde die Lösung opaleszent, undurchsichtig weiß. Dagegen kam es, wenn ich nach der vollständigen Entfernung des Kochsalzes durch Dialyse Chlorkalzium hinzufügte, zur Bildung eines Niederschlags. Schon eine geringe Menge Kochsalz genügte, um die Bildung eines Niederschlags durch Chlorkalzium zu verhindern. Umgekehrt war auch die Chlorkalziumfällung schon in 1proz. Kochsalzlösung leicht löslich.

In dieser Beziehung ist das nucleinsaure Histon-Alkali der Lymphdrüsen von jenem der Thymus verschieden.

Eine genauere Untersuchung lehrte, daß auch bei Abwesenheit von Kochsalz die Fällung durch Chlorkalzium nicht ganz vollständig ist. Etwas Nucleinat blieb in der Lösung zurück und konnte daraus durch Essigsäure niedergeschlagen werden.

Da nun der Chlorkalziumniederschlag schon in 1proz. Kochsalzlösung löslich ist, konnte man vermuten, daß auch bei der Extraktion mit 0,9proz. Kochsalzlösung das Nucleinat zwar extrahiert würde, nicht aber durch Chlorkalzium nachgewiesen werden könnte. So ist es auch. Wenn ich nämlich das Kochsalzextrakt dialysierte, bewirkte ein nachträglicher Zusatz von Chlorkalzium einen reichlichen Niederschlag, aus welchem man auch das Nucleinat darstellen konnte. Auch wurden, wie schon vorher bemerkt, die Zellen schon bei Kochsalzextraktion teilweise aufgelöst.

Auch wenn man mit Kochsalz und Chlorkalzium (0,9 Proz. $NaCl$ + 0,01 Proz. $CaCl_2$) extrahiert, kann man das Nucleinat nicht in den Zellen zurückhalten. Die Verwendung von $Ca(OH)_2$ macht da keinen Unterschied.

Dieser reaktionellen Unterschiede ungeachtet ist jedoch das Nucleinat ein veritables nucleinsaures Histon. Soweit sich nach den Reaktionen der Spaltungsprodukte urteilen läßt, kommen hier dasselbe Histon, Parahiston und dieselben Nucleinsäuren vor, und zwar in Form desselben Salzes wie in der Thymus. Da ich aber die Substanz noch nicht analysiert habe, möchte ich keine bestimmte Meinung hierüber aussprechen. Einer vorläufigen Phosphorbestimmung nach ist die Nucleinsäuremenge viel kleiner als in der Substanz aus Thymus. Dagegen sind die Fällungs-

grenzen des Nucleinats dieselben — von 70 bis 90 Proz. Ammonsulfatlösung.

Das Nucleoproteid verhält sich ganz wie das der Thymus: Es wird von 0,3 proz. Salzsäure in ein Albuminat und ein Nuclein gespalten. Die Fällungsgrenzen derselben liegen wie bei dem der Thymus: beide werden von 20 proz. Ammonsulfatlösung ausgesalzen.

Der Phosphorgehalt spricht entschieden für die Identität beider Nucleoproteide, indem das der Lymphdrüsen 0,83 Proz. P enthält.

Zum Vergleich mit den Thymuszellen hat es ein Interesse, zu untersuchen, wie sich die Eiweißkörper in den Lymphdrüsen verteilen. Ich habe deswegen die Zellen isoliert und wie die der Thymus untersucht.

	Thymus	Lymphdrüsen
Wasser	80,41 Proz.	80,41 Proz.
Feste Stoffe	19,59 „	19,59 „
Eiweißkörper	15,52 „	13,79 „
Nucleinat	3,15 „	0,69 „
Nucleoproteid . . .	1,08 „	1,06 „
Alkohollösliche Stoffe .	2,48 „	4,76 „
Asche	1,59 „	1,05 „

Wir sehen hieraus, daß das Nucleoproteid in Thymus und Lymphdrüsen in ganz derselben Menge vorkommt. Beim Nucleinate ist das nicht der Fall. Die Menge desselben ist in den Lymphdrüsen sehr viel geringer, es kommt hier nur zu 5 Proz. gegen 20 Proz. in der Thymus vor.

Es geht hieraus mit Bestimmtheit hervor, daß die Lymphdrüsenzellen nicht mit den Thymuszellen identisch sind. Dagegen kann man nicht eine Verwandtschaft leugnen, die in dem Vorkommen des Nucleinates zum Ausdruck kommt.

Es fragt sich dann weiter: sind die Lymphdrüsenzellen mit den Leucocyten, Knochenmarkzellen und Milzzellen identisch? Was die Leucocyten betrifft, so ist die Identität schon darum nicht anzunehmen, weil die Lymphdrüsenzellen kein Fibrinferment enthalten.

2. Das rote Knochenmark

wird auch zu den lymphatischen Organen gerechnet. Ich habe es daher in die Untersuchung einbezogen.

Als Ausgangsmaterial dienten Rippen vom Ochsen, welche besonders reich an Knochenmark sind.

1200 g Rippen wurden reinpräpariert, zerkleinert und mit destilliertem Wasser extrahiert. Das Extrakt war rot gefärbt und ganz klar. Ein

Zusatz von Chlorkalzium bewirkte keinen Niederschlag, dagegen gab Essigsäure eine sparsame Fällung, welche jedoch kein Histon enthielt. Ein Albuminat ließ sich nachweisen. Das Knochenmark enthält somit höchst wahrscheinlich kein nucleinsaures Histon, und seine Elemente sind von denen der Lymphdrüsen verschieden.

3. Die Milz.

Als ich zu der Untersuchung dieser überging, erwartete ich, hier dieselbe Zusammensetzung wie bei den Lymphdrüsen zu finden, doch bestätigte sich diese Vermutung nicht ganz.

Einmal gab Chlorkalzium im Wasserextrakte der Milz einen weit geringeren Niederschlag als bei den Lymphdrüsen. Als ich ferner den Niederschlag nach Alkoholbehandlung mit 2proz. Kochsalzlösung extrahierte, konnte ich im Filtrate überhaupt nicht — auch nicht nach der Dialyse — Fällung mit Chlorkalzium erzielen. Nur eine geringe Opaleszenz trat ein. Auch Essigsäure bewirkte nur eine minimale Fällung, während Salzsäure einen nicht unbedeutenden Niederschlag gab. Nach Spaltung mit Salzsäure ließen sich geringe Spuren von Histon (Ammoniak- und Alkaloidreagensproben) nachweisen.

Bei Sättigung mit Kochsalz konnte ich auch aus dem Filtrate eine geringe Menge Histon darstellen. Im neuen Filtrate bewirkte ein Zusatz von 2 Volumen Alkohol zuerst nur eine Ausfällung des Kochsalzes. Nach 24 Stunden hatte sich aber auch etwas Nucleinsäure niedergeschlagen. Es steht somit fest, daß die Milz auch nucleinsaures Histon enthält, aber in noch geringerer Menge als die Lymphdrüsen. Den Reaktionen nach dürfte dieses Nucleinat mit dem der Lymphdrüsen identisch sein. —

4. Die Leucocyten des Blutes.

Zur Untersuchung der Leucocyten eignet sich am besten Pferdeblut. Da aber seine Beschaffung mit großen Schwierigkeiten verbunden war, habe ich nur etwa 6 Liter verarbeiten können. Davon waren 4 Liter mit 0,3proz. Ammoniumoxalat versetzt und 2 Liter defibriniert. Ich habe hauptsächlich Ochsenblut zur Verfügung gehabt. Da sich aber dieses nicht gut zu solchen Untersuchungen eignet, ist die Untersuchung leider nicht zu Ende geführt worden — es wurden nur 10 Liter Ochsenblut verarbeitet —; doch werde ich über die Resultate hier kurz berichten.

Meine Arbeitsmethode war folgende:

Das Blut wurde zentrifugiert, das Plasma bzw. Serum gesammelt, aufs neue zentrifugiert und filtriert. Danach ließ ich es 48 Stunden im Eisschrank stehen. Ohne Ausnahme hatte sich dann ein Niederschlag

gebildet, welcher durch Zentrifugieren gesammelt wurde. Dieser Niederschlag soll bekanntlich das Prothrombin, bzw. Thrombin enthalten.

Die Leucocyten hatten sich als eine Art Speckhaut über den Erythrocyten abgesetzt. Sie wurden mit einem Platinspatel abgeschabt, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschlemmt und sofort wieder zentrifugiert. — Der Leucocytenniederschlag wurde dann gesammelt und entweder mit 0,9 proz. Kochsalzlösung und dann mit Wasser, oder auch mit Wasser allein extrahiert. In einigen Fällen wurde er zuerst mit essigsäurehaltigem Wasser behandelt und nach Entfernung des Hämoglobins mit Salzsäure gespalten.

Der Plasma- (und Serum-)Niederschlag war teilweise im Wasser löslich, und die Lösung gab mit Chlorkalzium oder Essigsäure eine reichliche Fällung. Da das Filtrat der Chlorkalziumfällung mit Essigsäure keinen weiteren Niederschlag gab, darf man annehmen, daß von Chlorkalzium und Essigsäure dieselbe Substanz niedergeschlagen wird. Der Essigsäureniederschlag wurde mit 0,01 proz. Natronlauge versetzt, wobei eine schleimige Lösung resultierte. Nach einiger Zeit war die Lösung ganz klar und dünnflüssig geworden. Darin schwamm der Essigsäureniederschlag als durchsichtiger Schleimklumpen, der mit dem Glasstabe entfernt werden konnte. Der Essigsäureniederschlag war in 0,5 proz. HCl teilweise löslich. Das salzsaure Extrakt enthielt verhältnismäßig viel Eiweiß, das schon bei Neutralisation, bzw. bei Abstumpfung der sauren Reaktion ausfiel. In einigen Fällen gab das Filtrat hiervon überhaupt keine Biuretreaktion, in allen Fällen aber waren im Filtrate sowohl die Ammoniakprobe als die Alkaloidreagensreaktion ganz und gar negativ. Es liegt also hier ein Albuminat vor, welches übrigens dieselben Fällungsgrenzen wie das des Thymusproteides besaß.

Der Plasmaniederschlag enthält also kein Histon (vgl. auch später).

Der Chlorkalziumniederschlag war in verdünnten Neutralsalzlösungen, sowie in verdünntem Alkali nicht löslich. Versetzte man den durch Essigsäurefällung dargestellten Schleimklumpen mit Chorkalziumlösung, so schrumpfte er unter Weißwerden zusammen. Übrigens enthielt der Plasmaniederschlag Prothrombin, welches sich mit Chlorkalzium zu Thrombin umsetzte. Soviel ich nach meinen wenigen Versuchen sagen kann, stellt der Chlorkalziumniederschlag nicht selbst das Fibrinferment dar, sondern enthält es nur mechanisch beigemengt.

Aus den Leucocyten ließ sich durch Wasser eine Substanz extrahieren, welche sich ganz wie die aus dem Plasmaniederschlage verhielt. Sowohl Clorkalzium als Essigsäure bewirkten eine

Fällung, welche sich, wie oben beschrieben, verhielt. Die Leucocyten enthalten sonach anscheinend kein Histon und folglich auch kein nucleinsaures Histon.

Doch kann man dies nicht mit absoluter Sicherheit sagen. Ich habe in meiner Histonarbeit gezeigt, daß das Histon mit überschüssigem Eiweiß vermischt nicht von Ammoniak niedergeschlagen wird und ferner, daß die Histon-Eiweißverbindung in Ammoniak leicht löslich ist. Und in der Tat sind unsere Substanzen mit viel Eiweiß verunreinigt oder enthalten viel Eiweiß. Eine geringe Histonmenge konnte daher leicht übersehen werden und dies um so mehr, als ich verhältnismäßig geringe Mengen Substanz verarbeitete. Aus diesem Grunde habe ich auch nicht die Leucocyten nach meiner Thymusmethode auf nucleinsaures Histon verarbeitet.

Ich versuchte aber die Leucocyten durch Auswaschen mit essigsäurehaltigem Wasser zu reinigen; das Resultat blieb dasselbe wie vorher: Es ließ sich reichlich Albuminat, aber kein Histon nachweisen.

Ich bestimmte den Albuminatgehalt der Leucocyten in einem Versuch und konnte nicht weniger als 80 Proz. der festen Stoffe als Albuminat wiederfinden. Daneben dürfte es aber sehr schwer sein, Spuren von Histon nachzuweisen.

Zum Vergleich nahm ich Lymphdrüsen und extrahierte sie direkt mit 0,5proz. Salzsäure. Nach Neutralisation und Abfiltrieren des Albuminats konnte ich im Filtrate das Histon leicht und sicher nachweisen.

Endlich habe ich auch eine Anzahl Exsudate und Transsudate auf Histon untersucht. Es handelte sich um frische tuberkulöse Pleuraexsudate, Ascitesflüssigkeit bei Unterleibskarzinom u. a., im ganzen um sechs Untersuchungen. Die meisten Flüssigkeiten waren klar und gelb gefärbt und enthielten verhältnismäßig viele Leucocyten. Überschuß von Essigsäure (etwa 1 Proz.) bewirkte einen mehr oder weniger reichlichen Niederschlag, der jedoch niemals Histon enthielt. Man darf aber diesen Befunden nicht allzu großen Wert beimessen, da Autolyse nicht ausgeschlossen war. Doch möchte ich hier daran erinnern, daß ich früher Eiterzellen mit völlig negativem Resultate auf Histon untersucht habe.

Durch die Resultate meiner Untersuchung der Leucocyten erscheint es somit nicht ausgeschlossen, daß auch sie nucleinsaures Histon enthalten. Aber es muß hervorgehoben werden, daß sein Vorkommen auch nicht bewiesen ist. Und dies ist

wichtig. Lilienfeld hat bekanntlich angegeben, daß die Leucocyten Histon, durch Ammoniakreaktion nachweisbar, enthalten. Es kann kein Zweifel sein, daß Lilienfeld auf das Albuminat gestoßen, und ebenso wie Malengreau beim Thymusnucleoproteid, durch die Ammoniakreaktion getäuscht worden ist. Das Albuminat der Leucocyten verhält sich nämlich ganz wie das des Thymusproteids und kann sehr wohl eine solche Täuschung veranlassen.

Wenn ich aber die Frage nach der Existenz eines Nucleinates in den Leucocyten hier unentschieden lasse, so erlauben doch meine Untersuchungen den Schluß zu ziehen, daß die Leucocyten des Blutes in chemischer Beziehung von den Zellen der Thymus, der Lymphdrüsen und des Knochenmarks verschieden sind. Und dies ist nicht ohne Bedeutung. Auf Grund des mikroskopischen Bildes hat man bekanntlich angenommen, daß diese Zellenarten, jedenfalls die Lymphocyten und Leucocyten, identisch sind. Die gewöhnliche Auffassung ist auch, daß die Leucocyten von den Lymphdrüsen herstammen.

Nach meinen Untersuchungen zu schließen, scheint dies nicht der Fall zu sein, ist jedenfalls nicht bewiesen.

Im Blute kommen mehrere Arten Leucocyten vor: Makro- und Mikrocyten u. a. Vielleicht entsprechen bestimmte davon den Lymphocyten.

Eine chemische Differenzierung im Blute selbst ist undenkbar, und auf diesem Wege kann man wohl der Frage nach der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Leucocytenformen nicht näher treten.

Ich muß deswegen Lilienfeld vollkommen beistimmen, wenn er sein Material zur Untersuchung der Leucocyten außerhalb des Blutes suchte. Nach der eben begründeten Auffassung kann man dazu allerdings weder Lymphdrüsen noch Thymus benutzen. Will man eine eingehende Untersuchung der Leucocyten mit Berücksichtigung der verschiedenen Formen vornehmen, dann muß man nach meiner Ansicht den französischen Forschern, vor allem Metschnikoff, folgen und bestimmte, experimentell dargestellte Exsudate mit spezifischen Leucocyten verarbeiten.

5. Chemische Untersuchung der Rundzellen-Sarkome.

In den vorhergehenden Abschnitten habe ich die chemische Zusammensetzung der lymphatischen Organe mitgeteilt. Abgesehen von den Leucocyten, enthalten sie (Lymphdrüsen, Milz und Thymus) als spezifischen Bestandteil nucleinsaures Histon.

Da ich für alle übrigen Organe des Säugetierkörpers die Abwesenheit des Histons nachgewiesen habe, ist bei ihnen auch das Vorkommen des Nucleinates ausgeschlossen.

Da wir in dem vorigen Abschnitte gesehen haben, daß die mikroskopische Untersuchung der chemischen insofern nachsteht, als die letztere beträchtliche Differenzen anzeigt, wo die erstere geradezu Identität vermuten läßt, so muß man die chemische Untersuchung als eine wertvolle Reaktion sowohl zur Erkennung lymphatischen Gewebes überhaupt, als auch zur Differentialdiagnose zwischen den einzelnen lymphatischen Organen ansehen.

Dies ist um so wichtiger, als der Nachweis außerordentlich einfach ist. Man extrahiert den Organteil mit Wasser und versetzt das Extrakt mit einigen Tropfen Clorkalziumlösung. Tritt ein Niederschlag auf, so hat man aller Wahrscheinlichkeit nach ein lymphatisches Gewebe vor sich. Ist dieser Niederschlag in 1proz. Kochsalzlösung löslich, so liegt ein Nucleinat vor, das dem Typus der Lymphdrüsen und der Milz entspricht: Das Organ hat den Charakter dieser Gewebe. Ist er darin nicht löslich, so hat das Organ den Typus der Thymus oder der Leucocyten. Die Differentialdiagnose beruht dann auf dem Nachweis von Histon. Dieser wird am besten so geführt, daß man das Salzsäureextrakt neutralisiert und im Filtrate die Ammoniakreaktion und Alkaloidreagenzprobe anstellt.

Wie man sieht, ist der Nachweis sehr einfach. Bei der Untersuchung verschiedener Organe habe ich übrigens gefunden, daß keines davon ein Wasserextrakt gibt, welches mit Chlorkalzium einen Niederschlag gibt, ein Verhalten, das die Untersuchung wesentlich erleichtert.

Bekommt man mit Chlorkalzium keinen Niederschlag, so ist der negative Ausschlag für die Abwesenheit eines lymphatischen Organs beweisend.

Die praktische Bedeutung der chemischen Untersuchung liegt nun darin, daß man damit die Natur und Verwandtschaft der Heteroplasien erkennen kann.

Nach Cohnheims Theorie sollen die Geschwülste bekanntlich von einer im Fötalleben abgesprengten, normalen Zellengruppe abstammen, die auf einer fremden Stelle proliferiert. Anderen Theorien zufolge ist bekanntlich die Geschwulstbildung als eine irritative Zellenproliferation des normalen Gewebes anzusehen.

Nach der einen Theorie sind in der Geschwulst Zellen mit einer von dem normalen Gewebe verschiedenen Struktur zu erwarten, nach der anderen sollten die Geschwulstzellen von den

normalen Zellen desselben Gewebes herstammen und dieselbe Struktur haben. Die mikroskopische Untersuchung versagt hier. Denn die Form kann selbstverständlich bei Geschwulstzellen von den Mutterzellen sehr abweichen, bei rasch wachsenden Geschwülsten muß dies sogar der Fall sein.

Es ist zu erwarten, daß hier die chemische Untersuchung maßgebende Aufschlüsse geben wird, natürlich vorausgesetzt, daß die chemische Zusammensetzung des normalen Gewebes bekannt ist, wovon wir leider vielfach noch weit entfernt sind.

Auf Grund der von mir mitgeteilten Befunde kann man jetzt, soweit es sich um lymphatische Organe handelt, dieses Problem in Angriff nehmen. Als Untersuchungsmaterial habe ich selbstverständlich Sarkome benutzt.

Leider standen mir zwar mehrere Fibrosarkome, von eigentlichen lymphatischen Rundzellensarkomen aber nur eins zur Verfügung. Die Fibrosarkome waren sämtlich sehr zellenreich, in einem Fall konnte man beinahe an ein Rundzellensarkom denken. Sie stammten von Mamma, Pharynx und Haut her. Es handelte sich um fünf Fälle.

Die Untersuchung ergab bei ihnen dasselbe Resultat: Das Wasserextrakt gab mit Chlorkalzium keinen Niederschlag. Dagegen bewirkte Essigsäure eine mehr oder weniger reichliche Fällung und aus dieser Fällung ließ sich mit Salzsäure Albuminat abspalten. Das Albuminat wurde bei der Neutralisation schon bei schwach saurer Reaktion ausgefällt, und im Filtrate war die Biuretreaktion negativ.

Das Rundzellensarkom verdient eine genauere Beschreibung.

Bei einem Manne war vor einem Jahre ein Sarcoma testis exstirpiert worden. Eine Metastase in der Inguinalgegend wurde im Winter 1903 exstirpiert und mir zur Untersuchung übergeben. Die Geschwulst war faustgroß und wog etwa 300 g.

Sie wurde von dem anhaftenden Gewebe gereinigt und mit Sand zerstoßen. Das Wasserextrakt gab schon nach einigen Minuten mit Chlorkalzium einen Niederschlag. Nach 48 Stunden wurde koliert, zentrifugiert und filtriert. (Die Geschwulstreste wurden mit Wasser erschöpft und weiter verarbeitet.) Das Filtrat wurde mit Chlorkalzium niedergeschlagen und der Niederschlag wie gewöhnlich auf nucleinsaures Histon verarbeitet. (Im Filtrate des Chlorkalziumniederschlages konnte ich mit Essigsäure ein Nucleoproteid ausfällen.) Nach der Extraktion mit 2proz. NaCl-Lösung bekam ich eine Flüssigkeit, welche nach Verdünnung mit 1 Vol. Wasser keinen Niederschlag gab. Nach der Dialyse bewirkte dagegen ein Zusatz von Chlorkalzium einen nicht unbedeutenden Niederschlag. Dieser wurde im Wasser gelöst und ein aliquoter Teil qualitativ untersucht.

1. Bei Sättigung mit Kochsalz fiel ein Niederschlag aus, welcher die Reaktionen des Histons gab.

2. Im Filtrate war die Biuretreaktion positiv: Parahiston.

3. Zusatz von 2 Vol. Alkohol fällte im Filtrate Nucleinsäuren, welche in ihren Reaktionen mit jenen der Thymusdrüse übereinstimmten.

Es lag somit ein nucleinsaures Histon vor, welches seinen Reaktionen nach mit dem der Lymphdrüsen übereinstimmte.

Weiter wurde die Existenz des nucleinsauren Histons durch die Phosphorbestimmung gesichert. Der Phosphorgehalt betrug 5,18 Proz.

Wenn man aus dieser Untersuchung Schlüsse auf die Natur der Geschwulst ziehen will, begegnet man der Schwierigkeit, daß es sich um eine Metastase in die Inguinallymphdrüsen handelt. Es könnte darnach ebensowohl eine Proliferation der normalen Lymphdrüsenzellen, als eine Weiterentwicklung des Testissarkomes vorliegen.

Ich glaube annehmen zu können, daß es sich um ein direktes Übersiedeln der Geschwulst gehandelt hat. Erstens war die Geschwulst in Lymphbahnen (diese waren infiltriert) direkt zur Leiste vorgeschritten, und zweitens konnte ich auch einige Unterschiede des Geschwulstgewebes von der Zusammensetzung der Lymphdrüsen feststellen.

a) Die absolute Menge des Nucleinates war viel grösser als in den Lymphdrüsen. Die Geschwulst enthielt etwa 3,4 Proz. Nucleinat gegen 0,7 Proz. in den Lymphdrüsen; b) der Phosphorgehalt des Nucleoproteids betrug nur 0,48 Proz. P. Dagegen war die relative Menge der Nucleoproteide ungefähr dieselbe wie in den Lymphdrüsen. Sie betrug nämlich approximativ 2,78 g Nucleinat und 2,65 g Nucleoproteid.

Die metastatische Geschwulst besaß somit eine sowohl von der Thymusdrüse, als den Lymphdrüsen abweichende Zusammensetzung. Da sie aber nucleinsaures Histon enthielt, muß man dem Sarkom eine lymphatische Struktur zuschreiben.

Nimmt man an, daß das ursprüngliche Hodensarkom dieselbe Zusammensetzung besaß, so muß man, da wir weiter wissen, daß Histon in der Norm im Hoden nicht vorkommt, als das wahrscheinlichste ansehen, daß im vorliegenden Fall eine embryonale, im Hoden zurückgebliebene, lymphatische Zellengruppe Ausgangspunkt der Geschwulstbildung war. Unter dieser Annahme spricht dieses Resultat für die Richtigkeit der Cohnheimschen Theorie.

Auf einem so wichtigen und schwierigen Gebiet erlaubt natürlich eine einzige Untersuchung keine weitgehenden Schlüsse.

Auch soll die mitgeteilte Beobachtung nur Anregung zu weiterer Forschung bilden. Obwohl ich mir vorbehalte, bei Gelegenheit diese Untersuchungen fortzusetzen, möchte ich doch ausdrücklich betonen, daß mir eine Bearbeitung dieses Gebietes von anderer Seite nur erwünscht sein kann.

6. Juni 1903.

Analytische Belege.

Die Kohlenstoff-Wasserstoffanalysen wurden auf gewöhnliche Weise ausgeführt.

Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl-Wilfarth bestimmt.

Der Phosphor wurde als Pyrophosphat bestimmt. Die Substanz wurde nach Neumann mit Schwefelsäure-Salpetersäure oxydiert und als Molybdat ausgefällt.

Den Schwefel bestimmte ich nach der vorzüglichen und bequemen Methode von Clason.

Das Kalzium wurde in Übereinstimmung mit Huiskamp mit Essigsäure aus dem nucleinsauren Histon-Kalzium ausgezogen und nach Veraschung wieder gelöst und als Oxalat bestimmt.

Das Chlor bestimmte ich einfach durch Titrierung mit $^{n}/_{10}$ $AgNO_3$-Lösung in neutraler Lösung und mit Kaliumchromat als Indikator. Das Histon wird nämlich nicht von Silbernitrat gefällt.

Das Natrium wurde nach Osborne und Harris indirekt bestimmt.

I. Thymus.

Das Nucleoproteid.

Präparat No. I.

0,1484 g Substanz = 17,50 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4 = 16,51 Proz. N
0,2794 „ „ = 0,0066 g Asche. N = 16,91 „
0,5617 „ „ = 0,0250 „ Pyrophosphat = 1,22 „
0,2093 „ „ = 0,1195 „ H_2O und 0,3800 g CO_2 = 6,35 Proz. H und 49,50 C.

Präparat No. II.

0,2652 g Substanz = 0,0096 g Pyrophosphat = 1,01 Proz. P.

Präparat No. III (nach Huiskamp dargestellt).

0,3199 g Substanz = 36,30 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4 = 15,89 Proz. N
0,2343 „ „ = 0,0051 g Asche = 2,18 Proz., N = 16,24 Proz.
0,2956 „ „ = 0,0096 „ Pyrophosphat = 0,91 Proz. P.

Präparat No. IV (mit Alkohol ausgekocht).

0,5156 g Substanz = 0,0263 g Pyrophosphat = 1,42 Proz. P.

Präparat No. V (mit 20 Proz. Am_2SO_4-Lösung ausgefällt).

0,2013 g Substanz = 0,0072 g Pyrophosphat = 1,00 Proz. P
0,1713 „ „ = 0,0063 „ „ = 1,03 „ „

Präparat No. VI.

0,2268 g Substanz = 0,0193 g Pyrophosphat = 2,38 Proz. P
0,2314 g „ = 0,0174 „ „ = 2,10 „ „
0,1005 „ „ = 12,90 ccm $^{n}/_{10}$ H_2SO_4 = 16,57 Proz. N.

Präparat No. VII (das Albuminat).
0,3429 g Substanz. Nur Spur von Molybdat.
0,1401 „ „ = 16,60 ccm n/10 H_2SO_4 = **16,59** Proz. N.

Präparat No. VIII (der Rest nach 0,3proz. HCl-Extraktion).
0,2052 g Substanz = 0,0183 g Pyrophosphat = **2.49** Proz. P
0,2543 „ „ = 0,0245 „ „ = **2,69** „ „
0,1445 „ „ = 17,05 ccm n/10 H_2SO_4 = **16,58** Proz. N.

Das native nucleinsaure Histon-Kalzium.

Präparat No. I.
0,4066 g Substanz = 0,0800 Pyrophosphat = **5,49** Proz. P
0,1040 „ „ = 12,45 ccm n/10 H_2SO_4 = **16,76** Proz. N
0,1500 „ „ = 0,0768 g H_2O und 0,2398 g CO_2 = **5,68** Proz. H und **43,60** Proz. C
0,2610 „ „ ergab eine Kalziumoxalatmenge, welche 1,2 ccm einer Permanganatlösung (1 ccm = 0,0097 g Fe) entsprach = **Ca** = **1,59** Proz.
0,0590 g „ = 0,0051 g Asche = **8,64** Proz.

Präparat No. II.
0,3122 g Substanz = 0,0599 g Pyrophosphat = **5,35** Proz. P
0,1716 „ „ = 20,60 ccm n/10 H_2SO_4 = **16,81** „ N
0,2698 „ „ = 0,1277 g H_2O und 0,4344 g CO_2 = **5,35** Proz. H und **43,92** Proz. C.
0,7990 „ „ = 0,0308 g $BaSO_4$ = **0,53** Proz. S
0,1940 „ „ = 0,0170 „ Asche = **8,76** „

Präparat No. III.
0,3122 g Substanz = 0,0472 g Pyrophosphat = **5,15** Proz. P
0,1178 „ „ = 14,35 ccm n/10 H_2SO_4 = **17,05** Proz. N
0,1540 „ „ = 0,0798 g H_2O und 0,2458 g CO_2 = **5,76** Proz. H und **43,54** Proz. C
0,2439 „ „ = 1,2 ccm Permanganat = **1,70** Proz. Ca
0,2188 „ „ = 0,0182 g Asche = **8,31** Proz.

Präparat No. IV.
0,3391 g Substanz = 0,0610 g Pyrophosphat = **5,03** Proz. P
0,2943 „ „ = 0,0108 „ $BaSO_4$ = **0,50** Proz. S
0,4045 „ „ = 9,5 ccm Permanganat (1 ccm = 0,00071 g Ca) = **1,69** Proz. Ca.

Präparat No. V.
0,2877 g Substanz = 0,0531 g Pyrophosphat = **5,14** Proz. P
0,5810 „ „ = 0,0175 „ $BaSO_4$ = **0,43** Proz. S
0,4544 „ „ = 11,10 ccm Permanganat = **1,81** Proz. Ca*).

Präparat No. VI.
0,3069 g Substanz = 0,0574 g Pyrophosphat = **5,22** P
0,6796 „ „ = 0,0214 „ $BaSO_4$ = **0,43** Proz. S
0,5841 „ „ = 13,90 ccm Permanganat = **1,71** Proz. Ca.

---

*) Im Texte steht fehlerhaft 1,87 Proz. Ca.

Das Histon.

A-Histon.

1. 0,1736 g = 22,15 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 = **17,86** Proz. N
   0,1228 „ = Keine Asche.
2. 0,0906 g = 11,40 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 = 17,61 Proz. N
   0,0874 „ = 0,0012 g Asche = **1,37** Proz. . N in der aschefreien Substanz = **17,86** Proz.
3. 0,1007 g = 12,65 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 = 17,59 Proz. N
   0,0559 „ (!) = 0,0003 g Asche = etwa 0,5 Proz. . N in der aschefreien Substanz = **17,66** Proz.

B-Histon.

1. 0,1019 g = 12,90 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 = 17,72 Proz. N
   0,0892 „ = 0,0020 g Asche = 2,23 Proz. . N in der aschefreien Substanz = **18,12** Proz.
2. 0,1470 g = 18,45 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 = 17,57 Proz.
   0,1040 „ = 0,0025 g Asche = 2,40 Proz. . N in der aschefreien Substanz = **18,00** Proz.
   0,1310 „ = 16,30 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 = 17,42 Proz. . N in der aschefreien Substanz = **17,89** Proz. N.

Histon aus dem Nucleinate.

1. 0,2820 g = 32,00 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 . N in der aschefreien Substanz = **18,18** Proz.
   0,8276 „ = 0,0315 g $BaSO_4$. S in der aschefreien Substanz = **0,60** Proz.
   0,8276 „ = 0,1062 g Asche
2. 0,8148 g Substanz mit 0,0110 g Asche = 0,0380 g $BaSO_4$ = **0,64** Proz. S
3. 0,6146 g Substanz mit 0,0036 g Asche = 0,0287 g $BaSO_4$ = **0,60** Proz. S
4. 0,2071 g Histonchlorid = 0,0149 g Cl = **7,19** Proz. Cl
   „ „ „ = 2,10 ccm $^n/_{10}$ NaOH = 0,0074 g Cl = **3,59** Proz.
5. 0,2017 g Histonchlorid = 0,01438 g Cl = **7,13** Proz. Cl
   „ „ „ = 2,20 ccm $^n/_{10}$ NaOH = 0,00781 g Cl = **3,86** Proz. Cl
6. 0,3332 g Histonchlorid = 0,02467 g Cl = **7,40** Proz. Cl
   „ „ „ = 3,80 ccm $^n/_{10}$ NaOH = 0,01350 g Cl = **4,00** Proz. Cl.

Das Parahiston.

0,2979 g Substanz mit 0,0209 g Asche = 0,0450 g $BaSO_4$ = **2,23** Proz. S
0,0773 „ Substanz = 9,10 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 . N in der aschefreien Substanz = **17,72** Proz.

Die Nucleinsäure.

Präparat No. I.

0,1667 g Substanz = 0,0557 g Pyrophosphat = **9,34** Proz. P
0,1787 „ „ = 0,0595 „ „ = **9,30** „ „
0,1962 „ „ = 21,65 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4 = **15,45** „ N
0,1930 „ „ = 0,0726 g H_2O und 0,2530 g CO_2 = **4,18** Proz. H und **35,75** Proz. C.

Präparat No. II.

0,2535 g Substanz = 0,0860 g Pyrophosphat = **9,47** Proz. P
0,1393 „ „ = 15,40 ccm n/10 H_2SO_4 = **15,48** Proz. N
0,1692 „ „ = 0,0650 g H_2O und 0,2230 g CO_2 = **4,27** Proz. H und **35,95** Proz. C.

Präparat No. III.

0,3654 g Substanz = 0,1042 g $NaPO_3$ = 0,1136 g Pyrophosphat = **6,46** Proz. Na
0,1198 „ „ = 0,0400 g Pyrophosphat = **9,33** Proz. P
0,1346 „ „ = 14,30 ccm n/10 H_2SO_4 = **15,08** Proz. N

Präparat No. IV.

0,3147 g Substanz = 0,924 g $NaPO_3$ = 0,969 g Pyrophosphat = 0,0221 g P = **6,03** Proz. Na
0,2647 „ „ = 0,0860 „ Pyrophosphat = **9,07** Proz. P
0,3506 „ „ = 37,70 ccm n/10 H_2SO_4 = **15,09** Proz. N
0,2222 „ „ = do mit MgO destilliert = 0,25 ccm n/10 H_2SO_4 = **0,1** Proz. N
0,4953 „ „ mit 12proz. HCl destilliert. — Kein Phloroglucid
0,4385 „ „ „ 5 „ H_2SO_4 gespalten = 0,2550 g Silberbasenverbindung = **22,70** Proz.

Das eigentliche nucleinsaure Histon.

1. Essigsäure-Präparat.

0,2049 g Substanz = 0,0460 g Pyrophosphat = **6,27** Proz. P.

2. $CaCl_2$-Präparat.

0,3570 g Substanz = 0,0701 g Pyrophosphat = **5,48** Proz. P
0,5689 „ „ = 15 ccm Permanganat = **1,85** Proz. Ca
0,5540 „ „ = 0,0104 g $BaSO_4$ = **0,26** Proz. S.

Thymus getrocknet.

0,5962 g Substanz = 0,0592 g Pyrophosphat = **2,77** Proz. P.

Thymus mit Alkohol extrahiert und getrocknet.

0,5590 g Substanz = 0,0580 g Pyrophosphat = **2,88** Proz. P.

Bestimmung der Bestandteile der Thymus.

5,6000 g feuchte Zellen = 1,0968 g Trockensubstanz = **19,59** Proz.
1,0968 „ mit Alkohol ausgekocht = 0,9585 g = 2,47 Proz. alkohollösliche Stoffe.
0,9585 „ Substanz = 0,0890 g Asche = 1,59 Proz.
16,1402 „ mit Wasser quantitativ extrahiert und mit $CaCl_2$ niedergeschlagen. Im Filtrate mit Essigsäure gefällt. Essigsäurefällung = 0,1750 g = **1,08** Proz. Nucleoproteid, Ca-Fällung wie gewöhnlich behandelt 2proz. NaCl-Extrakt nach Verdünnung mit Essigsäure gefällt. Niederschlag = 0,5000 g = **3,08** Proz. Nucleinat.

Lymphdrüsen.

Nucleoproteid.

0,3452 g Substanz = 0,0102 g Pyrophosphat = **0,83** Proz. P.

Bestimmung der Bestandteile. Mesenteriallymphdrüsen vom Ochsen.

1,8856 g feuchte Zellen = 0,3694 g Trockensubstanz = **19,59** Proz.
0,3694 „ mit Alkohol ausgekocht = 0,2797 g = **4,76** Proz. alkohollösliche Stoffe.
0,2797 „ Substanz = 0,0198 g Asche = **1,08** Proz.
4,4647 „ mit Wasser quantitativ extrahiert, mit $CaCl_2$ niedergeschlagen und im Filtrate mit Essigsäure gefällt. Essigsäurefällung = 0,0475 g = **1,07** Proz. Nucleoproteid. $CaCl_2$-Niederschlag nach Alkoholbehandlung mit 2 proz. ClNalsg. extrahiert, mit Wasser verdünnt und mit Essigsäure gefällt. Essigsäurefällung 0,0310 g = **0,69** Proz. Nucleinat.

Sarcoma testis.

Nucleoproteid.
0,3475 g Substanz = 0,0060 g Pyrophosphat = **0,48** Proz. P.

Nucleinat.
0,2594 g Substanz = 0,0482 g Pyrophosphat = **5,18** Proz. P.

Autorenregister.

Bang, Studier over Nucleoproteider. Archiv f. Mathematik og naturvidenskab. **25**, No. 1.

Bang, Zur Frage des Nucleohistons. Diese Beiträge **1**, 189.

Bang, Bemerkungen über das Nucleohiston. Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 508.

Bang, Erwiderung gegen Kossel. Ebenda **31**, 407.

Bang, Studien über Histon. Ebenda **27**, 463.

Fleroff, Ueber einen histonähnlichen Körper aus Thymus. Ebenda **28**, 307.

Grund, Über den Gehalt des Organismus an gebundenen Pentosen. Ebenda **35**, 111.

Gümbel, Zit. nach Hofmeister. Über den Bau usw. der Eiweißkörper. Ergebnisse d. Physiologie I, 777.

Huiskamp, Über die Eiweißkörper d. Thymusdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 145.

Huiskamp, Über die Elektrolyse usw. des Nucleohistons. Ebenda. **34**, 32.

Hammarsten, Über die Eiweißstoffe des Blutserums. Ergebnisse d. Physiologie I. S. 330.

Herlant, Untersuchungen über die Nucleinsäuren aus reifer Lachsmilch, Thymus und Hefe. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. **44**, 148.

Kossel, Über die Nucleinsäuren. Archiv f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt. 1893, S. 157 u. 380.

Kossel und Neumann, Weitere Beiträge zur Kenntnis d. Nucleinsäure. Ebenda 1894, S. 194.

Kossel, Beitrag zur Physiologie d. Kohlehydrate. Ebenda 1894. S. 536.

Kossel und Neumann, Über Nucleinsäure und Thyminsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **22**, 74.

Kossel und Neumann, Darstellung u. Spaltungsprodukte d. Nucleinsäure. Berl. Berichte **27**, 2215.

Kossel, Über den gegenwärtigen Stand d. Eiweißchemie. Ebenda **34**, 3214.

Kossel, Über die Eiweißstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie **25**, 165.

Kossel und Kutscher, Beiträge zur Kenntnis d. Eiweißkörper. **31**, 165.

Kossel und Steudel, Weitere Untersuchungen über das Cytosin. Ebenda **38**, 49.

Kossel und Patten, Zur Analyse der Hexonbasen. Ebenda **38**, 39.

Kossel, Bemerkungen zu der Nucleohistonarbeit des Herrn Ivar Bang. Ebenda **30**, 520.

Kutscher, Beiträge zur Kenntnis d. Eiweißkörper. Ebenda **38**, 111.

Kutscher, Eine Methode zur Darstellung des Cytosins. Ebenda **38**, 170.

Lilienfeld, Zur Chemie der Leucocyten. Ebenda **18**, 473.

Lilienfeld, Über Blutgerinnung. Ebenda **20**, 89.

Malengreau, Deux Nucléoalbumines et deux Histons dans le Thymus. La Cellule, 17, 339.

Malengreau, Sur les Nucléines du Thymus. Ebenda **19**, 285.

Osborne und Harris, Die Nucleinsäure des Weizenembryos. Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 85.

Pauli, Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. 2. Mitt. Diese Beiträge **3**, 225.

Schmiedeberg, Über die Nucleinsäure aus der Lachsmilch. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. **43**, 57.

Schmidt, Zur Blutlehre usw. Zit. nach Hammarsten, s. oben.

Kürzere Mitteilungen.

3. Bemerkungen zu der Mitteilung von L. Langstein „Zur Kenntnis der Ochronose“.

Von Dr. **Emil Zdarek.**

In diesem Bande der „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ (3. u. 4. Heft, Seite 145—149) findet sich eine Abhandlung von Leo Langstein: „Zur Kenntnis der Ochronose“, die einige Bemerkungen über meine in der Zeitschrift für Heilkunde (XXIII. Bd., Jahrg. 1902 Heft X) erschienene Abhandlung „Über den chemischen Befund bei der Ochronose der Knorpel“ enthält, welche anscheinend durch ein Mißverständnis hervorgerufen sind und daher der Richtigstellung bedürfen.

Bei der von mir versuchten Darstellung der Uroleucinsäure aus dem weingelben Blasenharn zeigte der Anteil, der in den Äther übergegangen war, starkes Reduktionsvermögen und Grünfärbung mit verdünnter Eisenchloridlösung. In meiner Abhandlung heißt es, „der Rückstand, der bei der versuchten Darstellung der Uroleucinsäure gewonnen wurde, zeigte starkes Reduktionsvermögen, seine wässerige Lösung gab mit einer sehr verdünnten Eisenchloridlösung eine grüne Grenzschicht, die jedoch beim Mischen der Flüssigkeiten wieder verschwand“.

Mit diesem Rückstand ist selbstverständlich derjenige gemeint, der nach dem Verdunsten des Äthers vom ätherischen Auszuge zurückbleibt, und als solchen hat ihn auch Langstein aufgefaßt, indem er*) schreibt: „Die wässerige Lösung der durch Äther extrahierten Substanzen gab mit verdünnter Eisenchloridlösung eine rasch verschwindende Grünfärbung.“ Es ist daher nicht verständlich, wie er im weiteren Verlaufe seiner Abhandlung**) zu folgender Bemerkung kommt:

„Eigentlich sprach in dem Wiener Fall nur eine einzige Reaktion dafür, daß eine der beiden für Alkaptonurie charakteristischen Dioxysäuren mit dem Harn entleert wurde: das ist die Grünfärbung, die der Harn bei der Mischung mit verdünnter Eisenchloridlösung annahm. Hingegen mißlang die Darstellung der Alkaptonsäuren, die auch bei Anwesenheit geringer Mengen immer zu einem Resultate führt, und die die Schwarzfärbung bedingende Substanz erwies sich als stickstoffhaltig. Die Reduktion im Sinne der Anwesenheit der Dioxysäuren zu verwerten, geht nicht an, da dieselbe nicht dem in den Äther übergegangenen Anteil des Harnes zukam, sondern dem nicht ätherlöslichen Rückstand.“

Ich habe schon oben aus meiner Abhandlung die Angabe zitiert, daß der in den Äther übergegangene Anteil des Harnes stark reduzierte und mit Eisenchlorid die Grünfärbung gab, es lag also keine Berechtigung vor, diese beiden Reaktionen auf verschiedene Harnbestandteile zu beziehen.

Der weingelb gefärbte Harn aus der Blase reduzierte viel stärker als der Harn, der bereits eine schwarze Farbe angenommen hatte. Ob das Reduktionsvermögen nach langem Stehen des Harnes ganz schwindet, darüber habe ich keine Versuche angestellt.

Langstein führt noch folgendes aus meiner Arbeit im Auszuge an: „Der die Schwarzfärbung bedingende Körper, aus Knorpel und Harn dargestellt, war stickstoffhaltig und nicht in kristallisiertem Zustand zu

*) loc. cit. S. 146. — **) loc. cit. S. 147.

gewinnen.“ Eine so präzise Fassung, daß ich nämlich die Körper dargestellt hätte, welche die Schwarzfärbung bedingen findet sich in meiner Arbeit nicht. Übrigens gewinnt man bei dieser Stilisierung leicht den Eindruck, als ob die beiden Körper, die aus Harn und Knorpel dargestellt wurden, identisch seien, was ja nach den vorliegenden Elementaranalysen nicht möglich ist.

Der nächste Satz: „Die Untersuchung der Knorpel auf Chondroitinschwefelsäure zeitigte kein irgendwie verwertbares Resultat“ ist mir übrigens unverständlich. Die Knorpel wurden auf Chondroitinschwefelsäure nicht untersucht, sondern es wurde nur der Versuch gemacht, die Chondroitinschwefelsäure, sowie auch die übrigen aus dem Knorpel dargestellten Verbindungen aus dem Knorpel systematisch auszuziehen, wobei die Wahrnehmung gemacht wurde, daß die Menge der Chondroitinschwefelsäure, die so erhalten wurde, eine sehr geringe war.

Ferner ist auch der nächste Abschnitt*) nicht richtig zitiert, denn ich äußere mich auf Grund der chemischen Untersuchung in meiner Arbeit nirgends über die chemische Natur der Schwarzfärbung in den Knorpeln; ich spreche auch nirgends von einem engen Zusammenhange zwischen Alkaptonurie und Ochronose.

---

4. Über das Verhalten des Phenylglycins im tierischen Organismus.

Von **Fritz Rosenfeld.**

(Aus der I. medizin. Klinik d. Universit. Berlin. Dir. Geh. Rat E. v. Leyden.)

Bei meinen Untersuchungen über die Bedeutung der Indoxylreaktion für den Organismus prüfte ich gelegentlich auch die Wirkung des Phenylglykokolls auf den Pflanzenfresser. Die Anilinoessigsäure $C_6H_5.NH.CH_2$ COOH läßt sich bekanntlich leicht in Indol überführen**), und es steht zudem fest, daß bei der Indigosynthese aus Anilinoessigsäure Indoxyl sich als Zwischenprodukt bildet, das als o-Acetindoxyl leicht nachweisbar ist.***) Wenn auch diese meist pyrogenen Reaktionen keinen Rückschluß auf analoge Vorgänge im Tierkörper zulassen, so bietet andererseits die Verbindung als substituiertes Glykokoll Interesse genug für die Verfolgung ihrer physiologischen Wirkung. Besondere Rücksicht mußte zudem auf die Reinheit der zersetzlichen Substanz genommen werden.

Ich habe nun gefunden, daß auch reinstes Phenylglycin in Dezigrammdosen für Kaninchen giftig ist, indem es eine akute parenchymatöse Entzündung aller Organe des Unterleibs, bes. der Leber und der Nieren, hervorruft. Zudem erzeugt es stets Glykosurie. Die Verbindung verhält sich demnach im Organismus wie andere Anilinderivate†), welche gleichfalls Glykosurie hervorrufen. Eine vermehrte Indikanausscheidung konnte in keinem Falle beobachtet werden. Über das Schicksal des Phenylglycins selbst im Organismus kann ich vorläufig keine bestimmten

*) loc. cit. S. 146.

) J. Mauthner und W. Suida, Monatshefte für Chemie **10, 250, 254.

***) Vorländer, Indoxylbildung aus Phenylglycin-o-carbonsäure. Berichte d. deutsch. chem. Ges. 35, 1689 (1902). Vgl. Vorländer und Drescher, Berichte d. deutsch. chem. Ges. 34, 1857 (1901).

†) H. Brat, Deutsche med. Wochenschrift 1901.

Angaben machen. O. Schultzen und M. Nencki*) haben bereits vor 34 Jahren einen Versuch unternommen, die Umwandlung von Phenylglykokoll im Tierkörper zu verfolgen. Sie gingen von der Vermutung aus, daß ähnlich wie der Stickstoff des Glycins als Harnstoff wiedererscheint, so nach der Einführung des substituierten Glykokolls ein Diphenylharnstoff würde ausgeschieden werden. Die Experimente scheiterten an der Giftigkeit der Verbindung, bezüglich der die Autoren nur bemerken, daß die Tiere nach kleinen Dosen sehr bald starben. Die Glykosurie wurde anscheinend übersehen.

Das Phenylglycin wurde für meine Versuche aus Anilin und Monochloressigsäure nach der Methode von J. Mai**) dargestellt. Umkristallisiert wurde die Substanz aus der sechsfachen Menge heißen Wassers unter Verwendung von Tierkohle. Das reine Präparat schmolz bei 125 bis 125,5° (126,5 bis 127° korr.). Die über Schwefelsäure getrocknete Verbindung ergab in der Analyse folgende Zahlen:

0,1839 g Substanz gaben 0,4293 g CO_2; 0,0977 g H_2O,
$C_8H_9NO_2$ Berechnet C = 63,57 Proz., H = 5,96 Proz.
Gefunden C = 63,66 „ H = 5,90 „

Die käuflichen, sowie ältere Präparate sind weniger rein. Sie sintern schon von 100° an und schmelzen, unscharf von 110 bis 116°. Aus denselben ist die reine Anilinoessigsäure nur unter beträchtlichen Verlusten zu erhalten***). Die derben übereinander gelagerten Kristalle zeigen keine deutliche Form, sind frisch umkristallisiert fast farblos, beim längeren Stehen leicht gelblich.

Da die freie Säure in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich ist, diente das Natronsalz zu den Injektionen. Verabreicht wurde die Lösung in einer größeren Zahl von Versuchen an Kaninchen subkutan und durch die Schlundsonde.

Für mittelschwere Kaninchen liegt die Dosis minima letalis gegen 0,3 g des analysenreinen Präparates vom Schmelzpunkt 126,5 bis 127° (korr.). Ich hebe dies hervor, da O. Schultzen und M. Nencki (loc. cit.) keine Angabe über Schmelzpunkt oder Reinheit ihres sehr giftigen Präparates machen. Das Sektionsresultat stimmte in allen Fällen in erwähntem Sinne überein. In drei Fällen war der noch kurz vor dem Tode spontan gelassene bzw. in der Blase befindliche Harn bluthaltig. Stets reduzierte der Harn stark, drehte das polarisierte Licht nach rechts entsprechend 0,5 bis 0,8 Proz. Saccharose (Spez. Drehung + 34,68°). Die Gärungsproben waren stark positiv, das erhaltene Osazon war in kaltem Wasser schwer löslich, schmolz bei 204 bis 206° (unkorr.) und zeigte die Formen des Glukosazons. Die Proben auf Anwesenheit gepaarter Glukuronsäuren waren negativ. Ebenso wie erwähnt die Indoxylreaktionen, welche nach Jaffé und Obermeyer angestellt wurden. Die Glukosurie mag mit der starken Giftigkeit in einem gewissen Zusammenhang stehen und als sogenannte toxische Glukosurie aufgefaßt werden.

Bei der Verwendung unreiner Präparate wurde der Harn zuweilen beim längern Stehen dunkel bis schwarz, schneller nach Versetzen mit Alkali und ähnelte hierin den Harnen nach Anilineinführung. Bei Anwendung reiner Präparate habe ich diese Erscheinung nicht beobachtet.

---

*) O. Schultzen und M. Nencki, Über die Vorstufen des Harnstoffs im Organismus. Berichte d. deutsch. chem. Ges. **2**, 580 (1869).

) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **35, 580 (1902).

***) Bezgl. der Schmelzpunkte vgl. Paul J. Meyer, Berichte d. deutsch. chem. Ges. 8, 1152. Schwebel, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **10**, 2046. Michaelson und Lippmann, Compt. rend. **61**, 739.

A. W. Zickfeldt, Osterwieck/Harz.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

IV. Band. 9.—11. Heft

(Ausgegeben November 1903)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1903

Inhalt des 9.—11. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E. Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XXX.

Zur Kenntnis der Vorstufen des Fibrinferments.

Von **Dr. P. Morawitz.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Straßburg.

I.

Seitdem vor mehreren Dezennien Alexander Schmidt*) die fermentative Natur des Blutgerinnungsvorganges erkannt und durch diese fundamentale Entdeckung der experimentellen Erforschung aller die Gerinnung betreffenden Fragen eine sichere Grundlage gegeben hat, richtete sich das Interesse der Forscher, die sich mit dem Vorgang der Blutgerinnung beschäftigten, fast ausschließlich auf die Untersuchung der Bedingungen, die mit der Erzeugung und Wirkung des Fibrinfermentes im Zusammenhange stehen; denn man durfte mit Recht hoffen, durch Klarlegung dieser Fragen eine Erklärung nicht allein für die Gerinnungsvorgänge an sich, sondern auch für den flüssigen Zustand des Blutes in den Gefäßen finden zu können.

Leider ist diese Hoffnung nur zum geringsten Teil in Erfüllung gegangen; zwar zweifelt heute niemand mehr an der Bedeutung des Fibrinfermentes für die Blutgerinnung, da die besonders von Wooldridge**) und Lilienfeld***) gegen die fermentative Natur dieses Prozesses vorgebrachten Einwände als widerlegt angesehen werden können. Dazu kommt, daß in neuester Zeit die Schmidtsche Lehre durch Fuld†) eine neue Bestätigung erfahren hat: er konnte nämlich zeigen, daß das Zeitgesetz des Fibrinfermentes in gewissen, besonders günstigen Fällen im wesentlichen der für hydrolytische Fermente gültigen Schützschen Regel entspricht.

---

*) Pflügers Archiv **6**, 442.

**) Wooldridge, Die Gerinnung des Blutes. Deutsch von M. v. Frey. Leipzig 1891.

***) Zeitschr. f. physiol. Chemie **20**, 89.

†) Diese Beiträge **2**, 514.

Während also über diesen Punkt Klarheit herrscht, ist es dagegen nicht gelungen, eine Blutgerinnungstheorie aufzustellen, die geeignet wäre, alle bisher beobachteten Tatsachen in befriedigender Weise zu erklären. Trotzdem sind wir aber seit Schmidt in die Erkenntnis des Gerinnungsvorganges durch die Arbeiten der Dorpater Schule*), durch die Untersuchungen von Arthus, Pekelharing und besonders von Hammarsten, sowie zahlreicher anderer Forscher tiefer eingedrungen.

Einen großen Fortschritt bezeichnet die Entdeckung der Rolle, welche die Ca-Ionen**) bei der Entstehung des Fibrinfermentes spielen. Das Verdienst, zuerst nachdrücklich auf die Wirkung der löslichen, durch Oxalat fällbaren Kalksalze hingewiesen zu haben, gebührt Arthus und Pagès***), nachdem schon vor ihnen Hammarsten†), Green††), Ringer und Sainsbury†††) und Freund*†) die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung der Kalksalze gelenkt hatten.

Die sehr zahlreichen Hypothesen, mit Hilfe deren verschiedene Forscher die Wirkung der Kalksalze zu erklären versuchten, sind durch die grundlegende Arbeit Hammarstens*††) hinfällig geworden, da er einwandsfrei nachwies, daß die durch Oxalat fällbaren Kalksalze einzig und allein notwendig sind, um das Fibrinferment aus einer unwirksamen Vorstufe, dem Zymogen oder Proferment, in den wirksamen Zustand überzuführen, und hierbei durch keine anderen Substanzen (von den Ba- und Sr-Salzen abgesehen) ersetzt werden können. Dagegen vermag fertiges Ferment auch ohne Anwesenheit der durch Oxalat fällbaren Kalksalze die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin zu bewirken.

Die Ansicht Hammarstens ist heute allgemein anerkannt, nachdem sich auch Arthus von deren Richtigkeit überzeugt hat*†††). Um so auffallender erscheint es, daß gerade der bedeutendste Forscher auf dem Gebiete der Blutgerinnung, Alexander Schmidt, sich der Entdeckung von Arthus gegenüber durchaus ablehnend verhielt. Noch in seiner letzten Arbeit†*)

*) Zusammenf. Referat bei Schmidt, Zur Blutlehre. Leipzig 1892.
) Sabbatani, Ref. Centralbl. f. Physiol. **16, 665.
***) Arch. de Physiol. **5**, 2 und Compt. rend. 112.
†) Nova acta reg. Soc. Scient. Upsal. **3**, 10, 1876.
††) Journ. of physiol. **8**.
†††) Daselbst **11** und **12**.
*†) Wiener med. Jahrb. 1888. 259.
*††) Zeitschrift f. physiol. Chemie **22**, 333.
*†††) La coagulation du sang. Scientia No. 5.
†*) Weitere Beiträge zur Blutlehre. Wiesbaden 1895.

leugnet Schmidt überhaupt die spezifische Wirkung der Kalksalze, indem er nur zugibt, daß die Kalksalze „unter Brüdern“ im wesentlichen das gleiche leisten, wie auch die übrigen Neutralsalze, da die Anwesenheit von Salzen schlechthin für die Gerinnung notwendig sei.

Schmidt entwickelt etwa folgende Anschauung über die Entstehung des Fibrinfermentes*): Im Plasma des zirkulierenden Blutes sowohl, als auch des Salzblutes ist unwirksames Prothrombin enthalten, das nicht durch Kalzium, sondern durch zymoplastische Substanzen aktiviert werden kann. Die zymoplastischen Substanzen entstammen den Leukocyten und treten bei dem der Gerinnung vorhergehenden Leukocytenzerfall in das Plasma über, wo sie das Proferment aktivieren. Jedoch wird bei der Blutgerinnung nur ein verschwindend kleiner Teil des Prothrombins durch die zymoplastischen Substanzen in den wirksamen Zustand übergeführt. Bei weitem die größte Menge verharrt in der inaktiven Form, da die in dem Plasma vorhandenen oder bei der Gerinnung in dasselbe übertretenden gerinnungshemmenden Substanzen der weiteren „Spaltung“ des Profermentes hindernd im Wege stehen, und die Menge der zymoplastischen Substanzen im Plasma schon an sich zu einer völligen Spaltung des Prothrombins nicht hinreicht.

Die beiden antagonistisch wirkenden Faktoren befinden sich im Serum in einem Gleichgewichtszustande. Stört man dieses Gleichgewicht, z. B. durch Hinzufügung zymoplastischer Substanzen, so wird aus dem Proferment eine neue Menge Ferment abgespalten. Auch durch vorübergehende Erhöhung der Alkaleszenz des Serums kann man ohne Zusatz zymoplastischer Substanzen eine weitergehende Spaltung des Profermentes bewirken, da Alkalien die Einwirkung der aktivierenden Elemente auf das Proferment begünstigen. Zymoplastische Substanzen werden durch mehrtägige Extraktion der verschiedensten Zellen, besonders der Lymphocyten, mit Alkohol gewonnen; doch können sie, wenn auch in geringerer Menge, direkt aus dem Serum hergestellt werden. Sie sind hitzebeständig, in Alkohol, zum Teil auch in Wasser und Äther löslich und nicht diffusibel. Der in Alkohol unlösliche Rückstand der Zellen liefert ein Wasserextrakt, das ausgesprochen gerinnungshemmende Eigenschaften hat, die an einen Eiweißkörper, das Cytoglobin, gebunden sind, während über die chemische Natur der zymoplastischen Substanzen nichts Sicheres gesagt werden kann. Nach v. Samson-Himmel-

*) Centralbl. f. Physiol. 4, 257 und Zur Blutlehre 1892.

stjerna*) und Nauck**) zeigen Lezithin, Taurin und die meisten Purinbasen zymoplastische Wirkungen. Im zirkulierenden Blute ist kein Cytoglobin nachzuweisen, doch kann man annehmen, daß der gerinnungshemmende Atomkomplex desselben auch im Plasma des zirkulierenden Blutes existiert und die geringen Fermentmengen neutralisiert, die durch Spaltung des Prothrombins auch in der Blutbahn entstehen, wie Birk***) gezeigt hat. Der gerinnungshemmende Atomkomplex des Cytoglobins wird durch Kochen zerstört und ist diffusibel.

Diese kurz skizzierten Anschauungen über die Bildung des Thrombins, die Schmidt in einer Reihe von Arbeiten niedergelegt hat, weichen so vollständig von der herrschenden Ansicht von der Aktivierung des Profermentes durch Ca ab, daß es merkwürdig erscheint, wie sie nicht mehr Widerspruch oder zahlreiche Nachuntersuchungen herausgefordert haben. Zwar hat Arthus†) einige von den Einwänden Schmidts gegen die Bedeutung der Kalksalze zu entkräften versucht. Schmidt hatte nämlich die Ungerinnbarkeit des nach den Angaben von Arthus hergestellten Oxalatplasmas auf den Oxalatgehalt desselben bezogen, indem er nach Entfernung des Oxalates durch Dialyse auf Zusatz von Kochsalz und zymoplastischen Substanzen Gerinnung eintreten sah. Arthus wies nach, daß das Oxalatplasma Schmidts offenbar von Anfang an fermenthaltig gewesen war, daß aber die geringe Fermentmenge sich erst nach Entfernung des gerinnungshemmenden Oxalatüberschusses hatte geltend machen können. Doch läßt sich Arthus auf eine weitergehende Nachuntersuchung der Schmidtschen Befunde nicht ein, speziell nicht auf die Wirkung der zymoplastischen Substanzen. Über diese liegen überhaupt nur sehr spärliche Angaben in der Literatur vor. So will Lilienfeld a. a. O. die Wirkung der Schmidtschen zymoplastischen Substanzen auf ihren Gehalt an saurem Kaliumphosphat beziehen, scheint aber keine sehr deutlichen Erfolge gesehen zu haben. Ferner gelang es Spiro und Ellinger††), Hundeblut, das durch vorhergehende Peptoninjektionen oder durch Hinzufügung von Blutegelextrakt ungerinnbar geworden war, durch Zusatz zymoplastischer Substanzen in alkalischer Emulsion zum Gerinnen zu

---

*) Über leukämisches Blut nebst Beobachtung, btr. die Entstehung des Fibrinfermentes. I.-D. Dorpat 1885.

**) Über eine neue Eigenschaft der Produkte der regressiven Metamorphose der Eiweißkörper. I.-D. Dorpat 1886.

***) Das Fibrinferment im lebenden Organismus. I.-D. Dorpat 1881.

†) Archive de physiol. 1896, 47.

††) Zeitschr. f. physiol. Chemie **23**, 121.

bringen. Weitere Angaben über Schmidts alkohollösliche Kinasen liegen nicht vor. Auch hat bisher niemand gesucht, die Schmidtsche Gerinnungstheorie auf ihre Richtigkeit zu prüfen oder mit den Beobachtungen der anderen Forscher, besonders Hammarstens und Arthus', in Einklang zu bringen. Es mag dieses wohl zum großen Teil daran liegen, daß durch die fortgesetzte und meist wenig glückliche Polemik Schmidts gegen Hammarsten und Arthus das Vertrauen auf die Richtigkeit der Schmidtschen Beobachtungen erschüttert war. Der einzige Autor, der nachdrücklich auf die Unvereinbarkeit der Schmidtschen Lehre von den zymoplastischen Substanzen mit der Kalziumtheorie hinweist und nicht einfach über dieselbe zur Tagesordnung übergeht, ist Hammarsten (a. a. O.), der eine genaue Nachuntersuchung der Schmidtschen Befunde als durchaus notwendig bezeichnet, indem er sagt: „Die Lehre (von der Ca-Wirkung) scheint mir auch fortgesetzter Untersuchungen sehr bedürftig zu sein, namentlich weil sie die von Schmidt behauptete Wirkung der zymoplastischen Substanzen ganz außer acht läßt."

Da sich Hammarsten jedoch diesen Problemen nicht mehr zugewandt hat und auch von anderer Seite in den letzten Jahren keine Untersuchungen über diese Fragen angestellt worden sind, schien es wünschenswert, zunächst die Frage zu entscheiden: Wie erklärt sich der Widerspruch in den Angaben über die Aktivierung des Prothrombins?

II.

Technische Vorbemerkungen.

Bevor auf die Versuche selbst eingegangen werden soll, seien einige Bemerkungen über die Technik vorausgeschickt.

Die Versuche wurden fast ausschließlich mit Pferdeblut angestellt; wo im folgenden keine Angaben über die Herkunft des Blutes gemacht werden, beziehen sich die Beobachtungen auf diese Blutart. Nur zu wenigen Versuchen wurde auch Rinder- und Hundeblut verwendet. Pferdeblut wurde bevorzugt, weil es bekanntlich sehr schnell die geformten Elemente zu Boden sinken läßt und man leicht auch ohne Zentrifugieren größere Mengen körperchenfreien Plasmas erhält.

1. Die Fibrinogenlösung.

Als Indikator für die Wirkungen des Fermentes wurde eine Fibrinogenlösung benutzt, die nach der Methode Hammarstens*)

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 22, 333.

aus Pferdeplasma gewonnen wurde. Als sehr zweckmäßig erwies sich dabei die von Heubner*) angegebene Modifikation: Fällung des Fibrinogens bei neutraler, Lösung bei leicht alkalischer Reaktion. Dabei wird der bei dreimaligem Umfällen sonst sehr bedeutende Verlust, der durch Unlöslichwerden des Fibrinogens bedingt ist, ganz wesentlich reduziert und die ganze Prozedur abgekürzt. Auch die Methode von Reye**), die Fällung des Fibrinogens mit Ammonsulfat, kam gelegentlich zur Anwendung, bot aber keine Vorteile gegenüber der Fällung mit Kochsalz.

Das Verfahren war kurz folgendes: Pferdeplasma, das 0,2 bis 0,3 Proz. Ammonoxalat enthielt, wurde 24 bis 48 Stunden im Eiskasten stehen gelassen. Dabei fällt, wie schon Hammarsten (a. a. O.) erwähnt, ein schleimiger rötlich gefärbter Niederschlag aus, der in zusammenhängender Schicht den Boden bedeckt und sehr reich an Proferment ist, d. h. in einer Fibrinogenlösung auf Ca-Zusatz schnell Gerinnung bewirkt. Dieser mit Wooldridges (a. a. O.) A-Fibrinogen identische Niederschlag, den auch Wright***) erwähnt, besteht, zum Teil wenigstens, aus Trümmern geformter Elemente. Wartet man das Absitzen des Niederschlages nicht ab, sondern verarbeitet das Oxalatplasma sofort nach dem Niedersinken der geformten Elemente, so kann man nie mit Sicherheit darauf rechnen, eine vollständig profermentfreie Fibrinogenlösung zu gewinnen, d. h. eine Lösung, die mit Ca nicht gerinnt. Ebenso verhindert höhere Außentemperatur das Absetzen des Niederschlages. (Das ist ein Grund mehr, die Untersuchungen von Blut möglichst in den Wintermonaten vorzunehmen.) Dementsprechend gerinnt auch das frische, profermenthaltige Oxalatplasma auf Ca-Zusatz sehr prompt, während Plasma, das drei bis vier Tage gestanden hat, durch Ca nur sehr langsam, zuweilen auch gar nicht, zur Koagulation gebracht werden kann, wie schon Hammarsten beobachtet hat.

Das abgehobene Oxalatplasma wird dann mit Kochsalz in Substanz gesättigt. Der aus Globulinen und Fibrinogen bestehende Niederschlag steigt an die Oberfläche, so daß er durch Abhebern leicht vom Plasma getrennt werden kann. Er löst sich mit Hilfe des anhaftenden Salzes in schwach alkalischem Wasser meist schnell und vollständig. Vom ungelösten wird abfiltriert. Der Salzgehalt dieser Fibrinogen-Globulinlösung wird dann aräometrisch (Heubner a. a. O.) bestimmt, und das Fibrinogen bei neutraler Reaktion durch Halbsättigung mit Kochsalzlösung, die 0,1 Proz. Ammonoxalat enthält, also kalkfrei ist, ausgefällt. Durch zwei- bis dreimalige Wiederholung dieses Verfahrens erhält man vollständig ferment- und profermentfreie Fibrinogenlösungen, die tagelang mit oder ohne Ca flüssig bleiben.

Mehrfach habe ich gesehen, daß die Fibrinogenlösungen, die drei bis vier Tage teils bei etwa 5°, teils bei Eisschranktemperatur aufbewahrt worden waren, nicht allein eine allmählich fortschreitende Ausscheidung von umgewandeltem Fibrinogen in Form

---

*) Archiv f. experim. Pathol. u. Pharm. **49**, 229.

**) I.-D. Straßburg 1898.

***) The Lancet 1892.

zarter Flocken zeigten, sondern unter Umständen auch in typischer Weise gallertig geronnen. Der Vorgang der Gerinnung zeigte hierbei Eigentümlichkeiten, auf die es sich verlohnt mit einigen Worten einzugehen. Eine vier Tage alte Fibrinogenlösung, die als klare, nur leicht opalisierende Flüssigkeit aus dem Eiskasten in das Laboratorium gebracht worden war, war nach einer halben Stunde durch und durch geronnen, ohne daß weitere Einwirkungen stattgefunden hätten. Diese Erscheinung, die ich nur drei bis viermal an meinen Fibrinogenlösungen beobachtet habe, trat niemals im Oxalatplasma selbst ein. Sie erklärt sich wohl dadurch, daß das Oxalatplasma von vorneherein fertiges Ferment enthalten hatte, was keineswegs wunderbar ist, da bei der üblichen Entnahme des Blutes im Schlachthause dasselbe, wie ich mich überzeugt habe, stets in ausgedehnte Berührung mit den Wundrändern kommt. Diese geringen Fermentmengen haben im Oxalatplasma selbst keine Wirkung, ob wegen des Oxalatgehaltes oder aus anderen Gründen mag vorerst dahingestellt bleiben, vermögen aber, falls sie beim Umfällen des Fibrinogens nicht vollständig entfernt worden sind, allmählich die Koagulation herbeizuführen. Dabei scheint das Fibrinogen zunächst in eine lösliche Modifikation des Fibrins übergeführt zu werden, da die Flüssigkeit bei der Entnahme aus dem Eiskasten noch gar keine Gerinnungserscheinungen zeigt. Erhöhung der Temperatur, mechanische Erschütterungen usw. führen dann eine rasch, ja schußweise erfolgende Ausscheidung des Fibrins herbei, die an das Verhalten unterkühlter Flüssigkeiten erinnert. Versucht man das ausgeschiedene Gerinnsel in Kochsalzlösung zu lösen, so zeigt sich, daß ein geringer Teil noch löslich ist. Es handelt sich bei diesem Teil offenbar um mitgerissenes Fibrinogen. Dementsprechend enthält die von dem Gerinnsel befreite Flüssigkeit noch unverändertes Fibrinogen, wie durch den Gerinnungsversuch nachgewiesen werden kann. Dadurch wird der Gedanke nahegelegt, daß durch das noch unveränderte Fibrinogen eine gewisse Menge Fibrin in Lösung gehalten werden kann.

Einer genaueren Charakterisierung des gelösten Fibrins stellen sich viele Schwierigkeiten entgegen; vor allem ist man beim Versuch, dasselbe zu erhalten, zu sehr vom Zufall abhängig, auch geht die Modifikation zu leicht in den unlöslichen Zustand über. Deshalb ist eine Bestimmung der Salzfällungsgrenzen nur mit sehr großer Vorsicht zu verwerten. Es zeigte sich, daß der Körper in unlöslicher Form zum Teil schon bei 10 Proz. Ammonsulfatsättigung in Form zusammenhängender Gerinnsel ausfiel. Doch ist es natürlich zweifelhaft, ob diese Ausscheidung als Aussalzen im engeren Sinne aufgefaßt werden darf, oder ob der Zusatz von Ammonsulfat einfach als mechanisches Moment gewirkt hat.

Erfahrungen und Beobachtungen über ein lösliches Fibrin, das bei der fermentativen Umwandlung des Fibrinogens als Zwischenprodukt auftritt, sind schon sehr alt. Eichwald*) hat zuerst einige Tatsachen mitgeteilt, die von Alexander Schmidt**) in diesem Sinne gedeutet wurden. Besonders eingehend hat Hammarsten***) den Satz begründet, daß das Fibrinogen schon lange, bevor sich ein sichtbares Gerinnsel ausscheidet, unter Einwirkung geringer Fermentmengen in eine Modifikation übergeht, die im Gegensatze zum unveränderten Körper durch Kohlensäure gefällt wird, beim Gefrieren und Auftauen Gerinnsel ausscheidet und eine niedrigere Koagulationstemperatur aufweist.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß wir es auch in unserm Falle mit einem löslichen Fibrin in dem oben definierten Sinne zu tun haben.

Um Verluste und Ungenauigkeiten der Resultate, die diese gelegentlichen Veränderungen der Fibrinogenlösung mit sich bringen, zu vermeiden, wurden stets nur etwa 500 bis 700 ccm Plasma verarbeitet, woraus ein für zwei Tage reichender Vorrat an Fibrinogenlösung gewonnen werden kann, der Rest des Oxalatplasmas aber nach Zusatz von Toluol im Eiskasten aufbewahrt. Auf diese Weise ist man, da das Oxalatplasma selbst nie gerinnt und noch nach sechs Tagen zur Herstellung einer Fibrinogenlösung brauchbar ist, vom Material relativ unabhängig und vermißt nicht zu sehr die nordische Kälte, die Hammarsten bei seinen Untersuchungen so wertvolle Dienste geleistet hat.

Dagegen ist es ganz unzweckmäßig, das Fibrinogen im gefällten Zustande aufzubewahren, da es unter halbgesättigter Kochsalzlösung schon nach ein bis zwei Tagen fast ganz unlöslich wird.

2. Andere Indikatoren für Thrombin.

Man könnte daran denken, neben Fibrinogenlösung der Bequemlichkeit halber Oxalatplasma als Indikator für Fibrinferment zu verwenden. Jedoch gerinnt Oxalatplasma sehr schwer und nur auf starken Fermentzusatz. Hat doch z. B. Arthus (a. a. O.) anfänglich geglaubt, Oxalatplasma könne überhaupt mit Ferment nicht gerinnen und darauf seine Theorie der Ca-Wirkung aufgebaut.

Brauchbarer als Oxalat- ist nach Arthus†) das Fluoridplasma, das 0,3 Proz. Fluornatrium enthält und sogar ein quantitatives Reagens auf Fibrinferment darstellen soll, da auf Zusatz geringer

*) Beiträge zur Chemie der gewebebildenden Substanzen etc. Berlin 1873.
) Pflügers Archiv **11, 340.
***) Pflügers Archiv **19**, 603 und **22**, 443.
†) Journal de Physiol. et Pathol. gén. 1901, 887.

Serummengen nur partielle Gerinnungen auftreten. Diese Angabe, die mit dem fermentativen Charakter des Gerinnungsvorganges nicht recht in Einklang zu bringen ist, scheint wenig für die Methode zu sprechen. Deswegen wurde zunächst das Fluoridplasma als Indikator nicht angewendet.

Das Vogelblutplasma*), das bekanntlich spontan nicht gerinnt, bietet vielleicht einen gewissen Vorteil vor einer Fibrinogenlösung. Es ist zwar schwerer zu erhalten und muß sehr sorgfältig entnommen werden; aber man darf wohl glauben, daß die Verhältnisse bei der Gerinnung des Vogelblutplasmas denen einer normalen Blutgerinnung mehr entsprechen, als sie in einer dreimal umgefällten Fibrinogenlösung gegeben sind. Da man jedoch nicht alle bei der normalen Gerinnung beteiligten Momente hinreichend kennt, so kann man andererseits nicht ausschließen, daß der Gerinnungsversuch im Vogelblutplasma kompliziertere Bedingungen schafft als der an einer reinen Fibrinogenlösung vorgenommene. Da ich außerdem größere Mengen Material nötig hatte, mußte vom Vogelblutplasma abgesehen werden.

3. Die Fibrinolyse.

Auch die weder auf Ca-Zusatz noch spontan gerinnenden Fibrinogenlösungen können nicht als gänzlich sichere Indikatoren angesehen werden. Sehr häufig beobachtete ich nämlich das nachträgliche schnelle Verflüssigen eines bereits gebildeten Fibringerinnsels. Es handelte sich dabei um Fibrinolyse, die bisher nur wenig studierte Verdauung des ausgeschiedenen Fibrins durch ein sonst kaum bekanntes Ferment.

Die Ansichten über die Ursache der Fibrinolyse sind auch jetzt noch keineswegs vollkommen geklärt. Die meisten Untersuchungen weisen aber mit Sicherheit darauf hin, daß die Auflösung des Fibrins durch ein aus dem Blute stammendes fibrinolytisches Ferment ohne Mitwirkung von Mikroorganismen erfolgt. Schon vor vielen Jahren hat Plósz**) diese Ansicht ausgesprochen, die in neuerer Zeit besonders von Dastre***) fester begründet worden ist, der bei Ausschluß bakterieller Einwirkungen Fibrinolyse beobachten konnte. Hammarsten†), der die An-

*) Delezenne, Archiv de Physiol. **9** (2), 333 und C. R. de la Soc. de Biol. 1896, 782.

) Pflügers Archiv **7, 371.

***) C. R. de la Soc. de Biol. 9. Dezbr. 1893, 995. Archiv de Physiol. (5) VII. **2**, 408.

†) Pflügers Archiv **30**, 441.

gaben von Denis*) über sogen. lösliches Fibrin (nicht zu verwechseln mit dem löslichen Fibrin Eichwalds) nachprüfte, konnte bestätigen, daß sich Fibrin besonders bei Verunreinigung mit Leukocyten oder Globulin in Neutralsalzlösungen bei leicht alkalischer Reaktion auflöst. Ob diese Löslichkeit des Fibrins in konzentrierten Salzlösungen **) wirklich als fermentative Fibrinolyse aufgefaßt werden darf, muß zweifelhaft erscheinen. Salkowski***) führt die Verdauung des Fibrins auf die Wirkung von Bakterienfermenten zurück. Endlich haben noch Denys und de Marbaix†) gefunden, daß die Verdauung des Fibrins von dem Zusatz von Chloroform, Alkohol, Äther, sowie verschiedener anderer Substanzen abhängig ist; sie sprechen dem Chloroform usw. direkt eine fermentative Wirkung auf das Fibrin zu.

Trotzdem die Erscheinung der Fibrinolyse dem Zweck dieser Arbeit ferner liegt, sei es mir doch gestattet, mit einigen Worten darauf einzugehen. Denn ich konnte bei meinen Versuchen eine so rapid verlaufende Fibrinolyse beobachten, wie sie bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden ist. Die vollständige Auflösung eines dicken Gerinnsels, das das ganze Reagenzglas als feste Gallerte ausfüllte, erfolgte in solchen Fällen in einer Stunde bei Bruttemperatur, oft sogar noch schneller. Zarte Gerinnsel waren öfter schon in einer Viertelstunde vollständig verschwunden.

Diese Erscheinungen traten keineswegs konstant auf. Zumeist arbeitete ich mit Fibrinogenlösungen, in denen absolut keine Auflösung des gebildeten Fibrins zu erkennen war, ja sogar die Retraktion des entstandenen Fibrinkuchens fehlte.

In geringerem Maße als das ausgeschiedene Fibrin ist auch das gelöste Fibrinogen einer Umwandlung unterworfen, die zur Folge hat, daß konzentrierte Fibrinogenlösungen von Tag zu Tag bei der Gerinnung immer weniger Fibrin liefern und endlich ganz ungerinnbar werden. Diese schon von Hammarsten††) beobachtete Erscheinung habe ich auch in einem Falle zusammen mit einer außerordentlich rapid verlaufenden Fibrinolyse gesehen, so daß der Gedanke an eine gemeinsame, d. h. bakterielle, Ursache beider Erscheinungen naheliegt. Jedoch tritt das Verschwinden des Fibrinogens auch unabhängig von der Fibrinolyse auf. Daher

*) Nouvelles études usw. sur les substances albuminoïdes. Paris 1856 und Mémoire sur le sang. Paris 1859.

) Limbourg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **13, 450, 1889.

***) Zeitschr. f. Biologie **7**, 92, 1889.

†) Sur les peptonisations usw. Extrait de la Revue „La Cellule". 1. V. 2. fasc. 15 Déc. 1889. Louvain.

††) Pflügers Archiv **17**.

möchte ich nach allen meinen Erfahrungen diesen Erklärungsversuch ganz entschieden zurückweisen. Die große Inkonstanz des Eintretens der Fibrinolyse bliebe dabei ebenso unverständlich, wie der außerordentlich rapide Verlauf derselben. Auch ist das Fibrin gegen Auflösung durch Fäulniserreger sehr resistent. Auch die von anderer Seite (Dastre a. a. O.) beschriebene Fibrinolyse in steril aufgefangenem Blute ließe sich gegen die Annahme von Bakterieneinflüssen anführen.

Mithin bliebe nur die Annahme eines fibrinolytisch wirkenden Fermentes übrig, und es fragt sich nun, ob man irgend welche Anhaltspunkte für die Erklärung des Umstandes hat, daß dieses Ferment nur in gewissen Fällen so außerordentlich wirksam ist, während es sich meist überhaupt nicht nachweisen läßt.

In der Tat glaube ich, allerdings rein zufällig, wenigstens eine der hier beteiligten Bedingungen gefunden zu haben. Ich benutzte nämlich mehreremal zum Auffangen des Blutes eine Ammonoxalatlösung, die, wie sich nachträglich herausstellte, gegen Lackmus leicht sauer reagierte. Von diesem Blute konnte nur durch Zentrifugieren, und zwar ein stark blutig gefärbtes Plasma gewonnen werden; die Blutkörperchen setzten sich darin nur sehr mangelhaft ab. Gerade in diesen und, wie die Protokolle ergaben, ausschließlieh in diesen Fällen habe ich Fibrinolyse gesehen, wie sie oben beschrieben worden ist. Je stärker blutiggefärbt das Plasma war, je mehr geformte Elemente also durch den Oxalatzusatz zerstört worden waren, je schlechter sich die Blutkörperchen absetzten, um so intensiver verlief die Fibrinolyse in der durch dreimaliges Umfällen hergestellten Fibrinogenlösung. Dabei sei noch bemerkt, daß es auch nie gelang, gänzlich profermentfreie Fibrinogenlösungen aus diesem Plasma herzustellen. Andererseits gelingt es auch, in zentrifugiertem Oxalatplasma durch nachträgliche Neutralisation sehr starke Fibrinolyse hervorzurufen.

Diese Beobachtung macht es nun sehr wahrscheinlich, daß das fibrinolytische Ferment, das vielleicht durch Zerstörung der geformten Elemente frei gemacht worden ist, durch Neutralisation aktiviert wird. Es scheint dann bei der fraktionierten Salzfällung noch leichter mit dem Fibrinogen niedergerissen zu werden als das Fibrinferment selbst.

Daß das fibrinolytische Ferment in der Tat sich in der Fibrinogenlösung und nicht allein im zugesetzten Serum findet, ist leicht zu entscheiden, wenn man sich eine mit Ca gerinnende Fibrinogenlösung herstellt. Auch in solchen Fällen tritt Fibrinolyse ein.

Auffallend ist es, daß die Fibrinolyse in einer Fibrinogenlösung viel schneller zu verlaufen scheint als im Plasma, selbst wenn dieses sehr stark verdünnt ist. Welche Momente hierbei ausschlaggebend sind, muß vorerst dahingestellt bleiben. Jedenfalls liegt es nahe, an einen mit den Globulinen ausfallenden Antikörper zu denken, um so mehr als Gläßner*) und Delezenne**) erst kürzlich antitryptische Wirkungen des Blutserums festgestellt haben. Weitere Untersuchungen werden über diese Fragen sicher bald Aufschluß geben, nachdem in dem Vorhergehenden ein Weg gezeigt worden ist, fibrinolytisch wirksame Lösungen zu erhalten.

Dabei soll nun keineswegs behauptet werden, daß die Auflösung geformter Elemente durch Zusatz differenter Mittel unbedingtes Erfordernis für das Auftreten der Fibrinolyse ist. Dagegen spricht schon der Umstand, daß man im spontan gerinnenden Blute ohne Zusatz irgend welcher Mittel zuweilen auch Fibrinolyse auftreten sieht.

Ob man alle in der Literatur beschriebenen fibrinolytischen Vorgänge als Prozesse auffassen darf, die durch ein in dem Blute vorhandenes Ferment bewirkt werden, erscheint zweifelhaft; eine methodische Durcharbeitung des ganzen Gebietes ist daher sehr wünschenswert.

Für die vorliegenden Untersuchungen ist die Fibrinolyse nur insofern von Bedeutung, als sie eine Quelle zahlreicher Beobachtungsfehler sein kann. Es ist natürlich unmöglich, während der langen Dauer mancher Gerinnungsversuche fortwährend zu untersuchen, wie weit der Prozeß vorgeschritten ist, zumal sich die Versuche oft über 24 Stunden ausdehnen. Findet man z. B. am Morgen nach einem über Nacht ausgedehnten Versuch eine Reihe von Proben ungeronnen, so ist nicht ohne weiteres der Schluß gestattet, daß hier wirklich Gerinnung gefehlt hat.

Ein Beispiel mag das illustrieren:

Von zwei Eprouvetten wird die erste mit 5 Tropfen fermentativ stark wirksamen Serums, 5 ccm 0,4 proz. Ammonoxalatlösung und 15 ccm Fibrinogenlösung beschickt, die zweite in gleicher Weise, nur daß die Ammonoxalatlösung durch 5 ccm 0,3 proz. Oxalatplasma ersetzt wird.

Beginn des Versuches um 5 Uhr nachmittags bei 35°.

Um 6 Uhr ist die erste Probe total geronnen, so daß man das Glas umkehren kann, ohne einen Tropfen zu verlieren, die zweite ist ungeronnen.

Um 7 Uhr 15 Min. sind beide Eprouvetten vollständig flüssig, in der ersten ist auch keine Spur eines Gerinnsels zu sehen.

Am nächsten Morgen sind beide noch flüssig.

Nun werden beide Proben mit 2 ccm stark wirksamen Fermentes versetzt. Das zweite Röhrchen gerinnt nach $1^1/_2$ Stunden, das erste Röhrchen bleibt flüssig.

Falls in diesem Versuch, dem ich noch einige andere, freilich weniger prägnante, beifügen könnte, eine Beobachtung um 6 Uhr versäumt worden wäre, hätte man sehr leicht den Schluß ziehen können, daß auch Probe 1 ungeronnen geblieben sei. In solchen Fällen entscheidet der nachträgliche Zusatz größerer Mengen von Ferment.

*) Diese Beiträge **4**, 79.

) C. R. de la Soc. de Biol. **55, 132 (30. I.).

4. Die Fermentlösungen.

Als Fermentlösung kam fast ausschließlich Pferdeserum zur Verwendung, doch stand mir durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Dr. Heubner, Assistenten am pharmakologischen Institut, auch Schmidtsches Ferment aus Rinderserum zur Verfügung, das durch zweimonatliche Aufbewahrung unter Alkohol und nachfolgendes Trocknen gewonnen worden war. Der wässerige Auszug des trockenen Koagulums war fermentativ außerordentlich wirksam.

Die quantitativen Gerinnungsversuche wurden nach der Tropfenmethode angestellt, die bei Verwendung gleicher Pipetten nach den Ermittelungen Ostwalds als sehr exakt angesehen werden kann. Natürlich muß man die zu den Versuchen benutzten Reagenzgläser nach jedesmaligem Gebrauch auskochen, um mit Sicherheit alle anhaftenden Spuren von Ferment zu zerstören.

Daß stets Kontrollversuche neben dem eigentlichen Versuch angestellt wurden, braucht kaum erwähnt zu werden.

Als Zeitpunkt der erfolgten Gerinnung wurde, um eine einheitliche Beurteilung der Versuche zu ermöglichen, stets der Moment aufgefaßt, in dem der Spiegel der Fibrinogenlösung bei leichtem Neigen die Glaswände nicht mehr benetzte.

Bei der Verwertung der Resultate quantitativer Gerinnungsversuche muß es als Regel gelten, kleinere Differenzen der Gerinnungszeit, die natürlich die einzige Handhabe für die Beurteilung von Wirksamkeit und Menge des Fermentes bietet, um so eher zu vernachlässigen, je weniger scharf die Differenzen sich in einer langen Reihe von Versuchen und unter verschiedenen Bedingungen, wie z. B. bei verschiedenen Temperaturen erkennen lassen.

Je mehr man sich vor Augen hält, von wie zahlreichen Faktoren der Gerinnungsvorgang abhängig ist, um so vorsichtiger wird man in der Beurteilung der Resultate sein. Der Begriff „kleinere Differenzen" kann natürlich nicht mit einem Wort präzisiert werden; vielleicht wird man am besten fahren, wenn man sich an das Verhältnis 1 : 3 oder 1 : 4 als Grenzwert hält. Gerinnt z. B. von zwei Proben die eine in 10 Minuten, die andere unter gleichen äußeren Bedingungen in einer Stunde, so kann das als eine größere Differenz angesehen werden, während ein Unterschied der Gerinnungszeit, der sich zwischen 3 und 8 Stunden bewegt, mit viel größerer Vorsicht aufgenommen werden muß, besonders wenn man sich erinnert, daß bei geringen Enzymmengen eine strenge Gesetzmäßigkeit im Sinne der Fuldschen Regel nicht nachzuweisen ist, und die Erscheinungen, wie schon Alexander Schmidt gezeigt hat, ziemlich regellos werden, da der Einfluß der Fermentmenge dann deutlicher hervortritt.

Deswegen gelingt es auch nur unter sehr günstigen Bedingungen, das Zeitgesetz des Fibrinfermentes festzustellen. Fuld, der mit spontan nicht gerinnendem Vogelplasma und ungemein stark fermentativ wirksamem Muskelextrakt arbeitete, konnte durch Zusatz sehr geringer Fermentmengen, z. B. 0,2 bis 0,025 ccm eines Extraktes, Gerinnung hervorrufen, die in einer bis fünf Minuten vollendet war und eine ganz bestimmte Gesetzmäßigkeit zeigte.

Einige Versuche, die ich nach dieser Richtung hin mit Fibrinogenlösung und dem sehr wirksamen Schmidtschen Ferment anzustellen Gelegenheit hatte, ergaben Werte, die sich mit steigender Fermentmenge der Schützschen Regel immer mehr näherten, während geringe Fermentmengen eine deutlichere Abhängigkeit von der Menge des Fermentes zeigten und Zahlen ergaben, die in der Mitte zwischen der Schütz-Fuldschen Regel und einer einfachen direkten Proportionalität zur Fermentmenge standen.

Ein genaueres Eingehen auf diese Versuche ist nicht am Platz, da nur gezeigt werden soll, daß sich aus der Gerinnungszeit nur mit gewissen Einschränkungen Schlüsse auf die Menge des Fermentes ziehen lassen.

Die etwas ausführliche Besprechung der an sich einfachen Versuchstechnik rechtfertigt sich, wie ich glaube, dadurch, daß sich bei Kenntnis dieser Einzelheiten manche Schwierigkeit vermeiden läßt, die mit dem Arbeiten mit Fibrinogenlösungen verknüpft ist.

III.

Über das Prothrombin Alexander Schmidts und das Prothrombin im Sinne von Arthus, Hammarsten und Pekelharing.

Der Gegensatz, der zwischen der Schmidtschen Schule und der heute allgemein herrschenden Auffassung über die Aktivierung des Prothrombins durch Ca-Ionen herrscht, ist bereits oben kurz dargelegt worden.

Nach Arthus, Hammarsten und Pekelharing wird das Prothrombin lediglich durch Ca-Ionen in Thrombin übergeführt, nach Schmidt allein durch bestimmte Kinasen (zymoplastische Substanzen), während das Ca auf das Prothrombin ganz ohne Einfluß ist und nur die Einwirkung des Thrombins auf das Fibrinogen in seiner Eigenschaft als Neutralsalz begünstigt.

Nun ist aber die Aktivierbarkeit des Prothrombins durch die Ca-Salze durch die Arbeiten von Pekelharing*) und Hammarsten einwandsfrei sichergestellt und kann jederzeit mit Leichtigkeit durch Versuche am Oxalatplasma nachgeprüft werden, auch sind die Einwände, die Schmidt gegen die spezifische Wirkung der Ca-Salze an sich ins Feld führte, durch Arthus

---

*) Die Bedeutung der Kalksalze für die Blutgerinnung. Festschrift f. Virchow I. 1891.

(a. a. O.) beseitigt worden, so daß man die uns hier interessierende Frage dahin präzisieren kann: Inwiefern hat neben der Aktivierbarkeit des Prothrombins durch Ca-Ionen die Schmidtsche Lehre von den zymoplastischen Substanzen Geltung?

Als ich diese Untersuchungen aufnahm, war ich mit den Resultaten Schmidts noch nicht vollständig bekannt; um so wichtiger ist es, daß, wie ich nachträglich ersah, die Befunde an sich mit den Angaben Schmidts vielfach durchaus übereinstimmen; dagegen ergab sich bald, daß die von Schmidt gegebene Deutung Veranlassung zu Mißverständnissen geben mußte. Wie wenig geklärt die ganze Sachlage ist, geht am besten daraus hervor, daß Hammarsten*) in der vorzüglichen Darlegung des Gerinnungsvorganges, die er in seinem Lehrbuche gibt, sich darauf beschränkt, ganz objektiv die Anschauung Schmidts über die Fermentbildung der landläufigen, namentlich von Arthus und Pekelharing vertretenen, gegenüberzustellen und den Mangel der Einheitlichkeit und die noch herrschende Unklarheit hervorzuheben. Arthus (a. a. O.) begnügt sich in der sonst sehr guten zusammenfassenden Darstellung über eine Anzahl wichtiger, den Gerinnungsvorgang betreffenden Arbeiten nur mit der Erwähnung der direkten Einwände Schmidts gegen die Ca-Wirkung, ohne auf dessen Theorie weiter einzugehen.

1. Abnahme des Fermentgehaltes im Serum.

Den Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen gab die schon Alexander Schmidt bekannte Erscheinung, daß der Fermentgehalt des Serums beim Stehen an der Luft abnimmt. Auch in anderen Fermentlösungen wurde dieselbe Beobachtung von Tammann**) und Effront***) gemacht. Tammann äußert sich darüber in dem Sinne, daß er einen allmählich fortschreitenden Zerfall des Katalysators in unwirksame Elemente auch ohne Anwesenheit einer zu katalysierenden Substanz annimmt. Analoge Beobachtungen liegen auch über anorganische Katalysatoren vor †).

Im Pferdeserum findet dieses Unwirksamwerden bei Zimmertemperatur meist im Verlauf von 5 bis 6 Tagen statt, und zwar in der Art, daß die gerinnungserregende Wirkung des Serums unmittelbar nach der Blutentnahme am schnellsten, dann aber

*) Lehrbuch d. physiol. Chemie. 4. Aufl. 1899.

**) Zeitschr. f. physikal. Chemie 18, 26 (1895).

***) Diastasen 1, 140.

†) Ernst, Zeitschr. f. physikal. Chemie 37, 1901. Mc. Intosh, Journ. of physic. Chem. 15, 1902. Bredig, Anorgan. Fermente 1901, 45.

immer langsamer sinkt und sich endlich nach der angegebenen Zeit im praktischen Sinne dem Werte Null nähert, d. h. 1 ccm Serum vermag dann in 24 Stunden bei 35° 10 ccm Fibrinogenlösung nicht mehr zum Gerinnen zu bringen.

Die Geschwindigkeit der Abnahme des Fermentgehaltes ist in ausgesprochener Weise von der Temperatur abhängig: Serum, das im Eiskasten gehalten wurde, zeigte nach 12 Tagen noch sehr ausgesprochene fermentative Wirkungen, während eine andere Probe, die im Brutschrank einer Temperatur von etwa 35° ausgesetzt war, sich schon nach $2^1/_2$ Tagen vollkommen unwirksam erwies. Außer der Temperatur scheint auch die Reaktion des Serums für die Geschwindigkeit der Fermentabnahme insofern von Bedeutung zu sein, als Neutralisation gegen Lackmus den Ablauf des Vorganges verlangsamt, Vermehrung der Alkaleszenz einen deutlich beschleunigenden Einfluß ausübt.

Auch findet die Abnahme im Fermentgehalt zweier Sera, die von verschiedenen Tieren stammen, unter gleichen äußeren Bedingungen nicht ganz gleichmäßig statt, so daß ich 5 bis 6 Tage in Übereinstimmung mit Schmidt nur als Durchschnittswert bezeichnen kann. Vielleicht hängt das teilweise damit zusammen, daß der Fermentgehalt frischer Sera von vornherein schon recht große Differenzen aufweist. Auch der ungehinderte Zutritt von Luft wirkt, wie Schmidt gefunden hat, begünstigend auf den Fermentzerfall.

2. Gehalt des Serums an Proferment.

Von der Annahme ausgehend, daß das Proferment gegen die schädigenden Einflüsse, die den Fermentgehalt des Serums vernichten, größere Widerstandsfähigkeit zeigt, wurde der Versuch gemacht, die gerinnungserregende Wirkung durch Stehen abgeschwächter Sera durch Zusatz von Chlorkalzium in einer Konzentration von 0,1 Proz. zu erhöhen. Dabei mußte ein allzu großer Ca-Überschuß vermieden werden, da Horne*) dargetan hat, daß ein Gehalt von 2 bis 3 Proz. Chlorkalzium die Gerinnung verhindern kann, und nach Huiskamp**) schon 0,6 Proz. Chlorkalzium einen stark hemmenden Einfluß hat.

Der Zusatz von Chlorkalzium hat nun in der Tat in diesen schwach wirkenden Sera einen ausgesprochen gerinnungsbeschleunigenden Einfluß, wie ja kaum anders zu erwarten war, da z. B. Hammarsten***) gezeigt hat, daß sich auch die gerinnungs-

*) Journ. of physiolog. Chem. 19.
**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 32.
***) Zeitschr. f. physiol. Chemie 28.

erregende Wirkung frischer Sera durch Chlorkalziumzusatz deutlich erhöhen läßt, eine Beobachtung, die auch ich bestätigen kann.

Versuch:

Serum, 4 Tage bei Zimmertemperatur gehalten	Fibrinogen	$CaCl_2$	Temperatur	Geronnen nach
10 Tropfen	5 ccm	0,1 Proz.	35 °	1½ Std.
10 Tropfen	5 ccm	—	35 °	3½ Std.

Es entsteht nun die Frage, ob diese mäßige, aber konstante Beschleunigung der Gerinnung, die durch Zusatz von Kalziumchlorid sowohl bei Verwendung von Serum, als von Schmidtschem Ferment bemerkt wird, wirklich auf einer Aktivierung einer geringen Menge von Proferment beruht, die bei der Gerinnung der Überführung in Ferment entgangen ist, entweder aus Mangel an Ca-Ionen oder aus anderen, noch unbekannten Gründen. Hammarsten neigt sich der Ansicht zu, daß diese Ca-Wirkung wohl mehr auf andere Ursachen zurückzuführen sei als auf eine Aktivierung von Proferment, will aber die Frage nicht endgültig entscheiden.

In der Tat läßt sich zeigen, daß Ca auch noch in anderer Weise die Gerinnung einer Fibrinogenlösung befördert als allein durch Aktivierung von Proferment.

Schon a priori erscheint die Annahme, daß im Serum noch nachweisbare Mengen von Proferment enthalten sind, sehr wenig wahrscheinlich, wenn man daran denkt, daß jedenfalls im Blute Ca-Ionen stets in einer Menge vorhanden sind, die zur Aktivierung des gesamten Prothrombins hinreicht*). Ferner ist die durch Ca-Zusatz bewirkte Gerinnungsbeschleunigung nicht sehr bedeutend, und endlich ist es mir nie gelungen, ganz unwirksames Serum durch Ca-Zusatz zu aktivieren. Die letzte Beobachtung ist mit der Annahme eines Profermentgehaltes im Serum nicht recht vereinbar, da wir aus dem Verhalten des im Oxalatplasma ausfallenden Niederschlages wissen, daß das Proferment äußeren Einflüssen gegenüber resistenter ist als das Ferment.

Zur sicheren Entscheidung dieser Frage wurde Serum mit 0,1 Proz. $CaCl_2$ versetzt und zwei Stunden sich selbst überlassen. Man kann wohl als sicher annehmen, daß durch dieses Verfahren alles Proferment, falls noch solches vorhanden ist, aktiviert wird.

*) Sabbatani a. a. O.

Von diesem Serum wurden 5 Tropfen mit 5 ccm Fibrinogenlösung vermischt. Der Ca-Gehalt der Mischung betrug dann also etwa 0,005 Proz. Diese Mischung gerann nun regelmäßig langsamer als eine entsprechende Serum-Fibrinogenmischung, die 0,1 bis 0,2 Proz. $CaCl_2$ enthielt, und annähernd ebenso schnell wie eine Mischung, die überhaupt nicht mit Ca behandelt worden war.

Versuch:

Serum, 3 Tage alt	Menge	Fibrinogen	Nachtr. $CaCl_2$-Zusatz	Temp.	Geronnen nach
mit 0,1 Proz $CaCl_2$ versetzt u. 2 Stdn. stehen gelassen	5 Tropfen	5 ccm	—	Zimmertemp.	$5^1/_2$ Stdn.
ohne $CaCl_2$	5 Tropfen	5 ccm	0,1 bis 0,2 Proz.	do.	3 Stdn.
ohne $CaCl_2$	5 Tropfen	5 ccm	—	do.	6 Stdn.

Aus diesem Versuche läßt sich mit aller Sicherheit schließen, daß Ca die Gerinnungsgeschwindigkeit noch in einer anderen Weise beeinflußt, als lediglich durch Aktivierung von Proferment, und daß der Gehalt des Serums an Proferment entweder nur äußerst geringfügig, oder, was viel wahrscheinlicher, gleich null ist. Durchaus analoge Resultate erhält man, wenn man das zum Serum gesetzte Ca nach zweistündiger Einwirkung quantitativ durch Oxalatzusatz ausfällt, auch dann beobachtet man keine Gerinnungsbeschleunigung.

Und doch behauptete Schmidt, in dem unwirksamen Serum Ferment aktivieren zu können.

Falls es daher wirklich gelingt, aus unwirksamem Serum Thrombin durch irgend welche Maßnahmen zu entwickeln, muß man annehmen, daß es sich in einer unwirksamen Form im Serum findet, die nicht identisch ist mit dem durch Ca-Zusatz aktivierbaren Prothrombin.

3. Nachweis eines Profermentes im unwirksamen Serum.

Auf Vorschlag von Herrn Professor Hofmeister prüfte ich den Einfluß der allgemeinsten Katalysatoren, der Säuren, auf das unwirksame Serum.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß Serum mit dem gleichen Volumen $^n/_{10}$-Säure versetzt, gemischt und

nach $^{1}/_{4}$ bis $^{1}/_{2}$ Stunde zurücktitriert wurde, wobei sich eine durch die Säurewirkung entstandene leichte Eiweißfällung wieder löste.

Es stellte sich dabei heraus, daß vorher ganz unwirksames Serum sich nach dieser Behandlung außerordentlich wirksam erwies und eine Fibrinogenlösung in der kürzesten Zeit zum Gerinnen brachte.

Versuch:

Serum, 5 Tage bei Zimmertemperatur gehalten	mit Säure vorbehandelt	Fibrinogen	Geronnen nach
20 Tropfen	+	10 ccm	$1^{1}/_{2}$ St.
20 Tropfen	—	10 ccm	ca. 13 St.

Da bei der Behandlung mit dem gleichen Volumen $^{n}/_{10}$ Säure und nachfolgender Neutralisation das Serum auf das Dreifache verdünnt wird, muß diese Verdünnung bei Berechnung der Steigerung der fermentativen Wirksamkeit mit berücksichtigt werden.

Neben $^{n}/_{10}$ Schwefelsäure, mit der die ersten Versuche angestellt wurden, prüfte ich noch den Einfluß von Milchsäure, Essigsäure, Zitronen- und Oxalsäure, sowie einiger saurer Salze, des Monokaliumphosphats und des Kaliumhydrosulfats, weil mir diese Reagentien gerade zur Verfügung standen.

Qualitativ war die Wirkung in allen Fällen die gleiche; quantitativ zeigten sich dagegen Unterschiede, die, soweit aus der Gerinnungszeit Schlüsse gezogen werden dürfen, dafür zu sprechen schienen, daß die fermentaktivierende Kraft der zugesetzten Säuren mit der Dissoziation derselben ungefähr parallel geht. Genauere Angaben darüber zu machen, erscheint überflüssig, weil die einzige Reaktion auf den Fermentgehalt, die Gerinnung, wie schon oft hervorgehoben, keinen genügenden quantitativen Maßstab abgibt.

Gegen die Annahme, daß es in der Tat die Wirkung des H-Ions ist, die dem Serum wieder eine so bedeutende fermentative Wirkung verleiht, lassen sich zunächst mancherlei Einwände machen. Doch ergibt die Prüfung, daß keiner derselben stichhaltig ist. Man überzeugt sich leicht, daß die Verdünnung des Serums mit dem doppelten Volumen Wasser oder einem neutralisierten Gemisch von Schwefelsäure und Natron durchaus keinen Erfolg hat. Etwas mehr Berechtigung hat scheinbar der Einwand, daß die Gerinnungsbeschleunigung auf der Neutralisierung des Serums beruht; denn es ist in der Tat nicht zu leugnen, daß durch Zusatz geringer Säuremengen, die eben zur Neutralisierung gegen Lackmus ausreichen, auch eine, wenn auch nur geringe

gerinnungsbeschleunigende, Wirkung zu erzielen ist. Aber erstens ist diese Wirkung klein im Vergleich zu der, die man bei einem großen Überschuß von H-Ionen erhält, zweitens ist aber auch die ehedem verbreitete Anschauung von der alkalischen Reaktion des Serums oder Blutes durch neuere Untersuchungen*) dahin modifiziert worden, daß wir in dem Blut eine Lösung vor uns haben, die zwar gegen Lackmus alkalisch, gegen Phenolphthalein aber sauer reagiert. Wir können also nicht mehr von einer Neutralisation des Blutes, sondern nur noch von einer Vermehrung oder Verminderung der Konzentration der H-Ionen sprechen. Daß dann aber eine, wenn auch nur mäßige, Vermehrung die Entstehung des Fermentes im Serum begünstigt, ist ebenso klar, als die Tatsache, daß stärkerer Säurezusatz viel größere Effekte erzielt.

In einigen Fällen wurde dem angesäuerten Serum ein Tropfen Phenolphthalein als Indikator bei der nachfolgenden Neutralisation zugesetzt. Die aktivierende Wirkung der Säure war sowohl bei einer eben noch sauren, als bei eben alkalischer Reaktion in gleicher Weise nachweisbar.

Man ist also zu dem Schlusse berechtigt, daß die Bedeutung des oben beschriebenen Vorganges, den ich der Kürze halber als Aktivieren des Serums bezeichnen will, darin zu suchen ist, daß die H-Ionen in dem Serum eine Veränderung bewirken, welche die Bildung des Fermentes aus einer unwirksamen Vorstufe, einem Prothrombin, ermöglicht.

Einen ähnlichen Einfluß wie die Säuren üben auch Alkalien aus: Versetzt man unwirksames oder schwach wirksames Serum mit dem gleichen Volumen $^{n}/_{10}$ NaOH und neutralisiert nach $^{1}/_{4}$-bis $^{1}/_{2}$stündiger Einwirkung, so hat die fermentative Kraft des Serums in noch weit höherem Maße zugenommen als bei einer Aktivierung durch die gleiche Menge $^{n}/_{10}$ H_2SO_4.

Versuch:

Serum, 5 Tage alt	Aktiviert	Fibrinogen	Temperatur	Geronnen nach
10 Tropfen	mit Alkali	5 ccm	35°	10 Min.
10 Tropfen	mit Säure	5 ccm	35°	1 Std. 20 Min.

Die Aktivierung durch Alkali ist vom OH-Ion abhängig. Daher wirkt natürlich nicht nur NaOH, sondern auch NH_3, Na_2CO_3 etc. qualitativ gleich, quantitativ verschieden.

*) Vgl. z. B. Friedenthal, Zeitschr. f. allgem. Physiol. 1, 1.

Zwar sind die Wirkungen, die man durch das gleiche Volumen $^{n}/_{10}$ NaOH erhält, schon sehr bedeutend, jedoch nicht maximal. Der gesamte Vorrat an Prothrombin, soweit er durch diese Behandlungsmethode überhaupt wirksam gemacht werden kann, wird erst erschöpft, wenn man $^{1}/_{2}$ Stunde lang auf je 10 ccm Serum 2 bis 4 ccm Normalnatronlauge einwirken läßt. In solchen Fällen verläuft die Gerinnung selbst bei Zusatz ganz geringer Serummengen im Brutschrank in wenigen Minuten. Es gelingt auf diese Weise, den Wirkungswert abgeschwächter Sera auf das 20- bis 30fache oder noch mehr zu erhöhen.

Schon aus den oben aufgeführten Versuchsanordnungen, speziell der Wirkung der Oxal- und Zitronensäure, ergibt sich, daß zur Aktivierung unseres Prothrombins Ca-Ionen nicht erforderlich sind. Dabei ist zugleich erwiesen, daß es mit dem Prothrombin im gewöhnlichen Sinne des Wortes nicht identisch sein kann. Außerdem läßt sich natürlich auch zeigen, daß Serum, welches mit 0,5 Proz. Ammonoxalat versetzt ist, sich durch NaOH ebenso leicht aktivieren läßt, wie ohne Oxalatzusatz. Auch die vorhergehende Entfernung der Kalziumoxalatfällung durch Zentrifugieren ändert an diesem Verhalten nichts.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß unser Prothrombin mit dem Proferment Alexander Schmidts identisch ist, nicht aber mit dem durch Ca aktivierbaren Zymogen. Letzteres hat Schmidt überhaupt nicht gekannt. Daher stammen sein ablehnender Standpunkt gegen die Theorie der Ca-Wirkung und die Verwirrung, die durch das Zusammenwerfen dieser beiden ganz verschiedenen Begriffe in der Literatur entstanden ist.

Da die Verschiedenheit der beiden unwirksamen Fermentvorstufen schon durch diese Versuche sichergestellt ist, will ich, um weitere Mißverständnisse zu vermeiden, vorläufig nach dem Vorschlage Herrn Prof. Hofmeisters das durch Ca aktivierbare α-Proferment, das durch Säurealkali aktivierbare β-Proferment nennen, womit zunächst nichts über die Natur, namentlich über eine etwaige genetische Verwandtschaft, derart etwa, daß das β-Proferment vom α-Proferment abstammte, ausgesagt sein soll.

4. Eigenschaften und Vorkommen des β-Profermentes.

Schmidt kannte bereits die Möglichkeit, durch Alkali unwirksames Serum zu aktivieren, und stellte sich vor, daß sein

Proferment, das β-Proferment also, schon im zirkulierenden Plasma vorhanden sei. Nicht bekannt war ihm dagegen die Säureaktivierung, über die sich jedoch auch Andeutungen a. a. O. in der Literatur vorfinden. So glaubt Lilienfeld*) das wirksame Prinzip der sogen. zymoplastischen Substanzen im sauren Kaliumphosphat gefunden zu haben, ferner gibt Schmidt selbst an, daß sehr kleine Mengen Essigsäure die Gerinnung beschleunigen, ebenso Durchleiten von CO_2. Endlich fand ich nach Abschluß meiner Versuche eine Notiz von Fuld**), aus der hervorgeht, daß auch ihm bereits die beiden Arten der Aktivierung bekannt waren. Auf die theoretische Deutung, die Fuld dem Prozeß des Aktivierens gibt, will ich unten mit einigen Worten eingehen.

Zunächst sei bemerkt, daß die Ansicht Schmidts von der Präexistenz des β-Prothrombins im zirkulierenden Blut insofern unzutreffend ist, als es nicht gelingt, Oxalat- und Fluoridplasma durch die Alkali-Säurewirkung zum Gerinnen zu bringen, selbst wenn es vorher durch Dialyse von seinem Salzgehalt nahezu befreit oder nach dem Aktivieren mit Fibrinogenlösung stark verdünnt wird.

Demnach ist im Oxalatplasma nur α-, aber kein β-Proferment enthalten.

Dagegen findet sich β-Proferment in jedem Serum, mag es nun ganz frisch oder schon alt und wirkungslos sein. Man muß daher annehmen, daß seine Entstehung mit dem Vorgang der Gerinnung oder der Bildung des Thrombins aus dem α-Proferment in irgend einer Weise zusammenhängt.

Bevor die Möglichkeiten der Abstammung und Bildung des β-Profermentes weiter erörtert werden, seien noch einige Angaben über das β-Proferment selbst gemacht.

Besonders charakteristisch ist seine große Resistenz gegen die schädigenden Einflüsse, die das Verschwinden des fertigen Thrombins im Serum veranlassen. Anscheinend nimmt der Gehalt des Serums an β-Proferment beim Stehen überhaupt nicht ab, wenigstens bevor sehr intensive Fäulnis eintritt; denn ganz frisches Serum läßt sich durch die gleiche Menge Alkali unter genau denselben Bedingungen nicht stärker aktivieren als fünf Tage altes Serum.

---

*) a. a. O.

) Biochem. Centralbl. **1, 4.

Versuch:

Serum	Fibrinogen	Temperatur	I. Versuch Geronnen nach	II. Versuch Geronnen nach
frisch, nicht aktiviert 5 Tr.	5 ccm	35°	$3^1/_2$ Stdn.	—
frisch, aktiviert 5 Tr.	do.	do.	8 Min.	15 Min.
5 Tage alt, nicht aktiviert 5 Tr.	do.	do.	nach 7 Stdn. ungeronnen	—
5 Tage alt, aktiviert 5 Tr.	do.	do.	10 Min.	12 Min.

Dabei muß man allerdings bedenken, daß man durch einmalige Einwirkung eines gleichen Volumens $^n/_{10}$-Normallauge das β-Proferment nicht vollständig aktiviert. Man kann das auf folgende Weise zeigen: Die durch das Aktivieren frei gewordene gewaltige Fermentmenge verschwindet schon innerhalb sehr kurzer Zeit aus dem Serum. Bereits nach wenigen Stunden ist eine Abnahme zu bemerken, nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur ist das Serum ganz oder nahezu ganz wirkungslos. Versucht man solches Serum von neuem zu aktivieren, so gelingt es, falls man das Aktivieren mit dem gleichen Volumen $^n/_{10}$-NaOH vorgenommen hat, noch einmal, nicht aber zum dritten Male.

Dieser Versuch ist nach zwei Richtungen hin von Bedeutung: einmal zeigt er uns, daß das Ferment, welches aus β-Prothrombin gewonnen wurde und das wir als β-Ferment bezeichnen wollen, ungleich viel schneller aus dem Serum verschwindet, als das α-Ferment, das bei der normalen Gerinnung entsteht und, wie oben erwähnt, erst in 5 bis 6 Tagen verschwindet, obwohl es, der Wirksamkeit nach zu schließen, an Menge sehr hinter dem β-Ferment zurücksteht. Dies legt den Gedanken nahe, daß α- und β-Ferment überhaupt nicht miteinander identisch sind. Ferner aber lehrt dieser Versuch, daß das Verschwinden des β-Fermentes aus aktiviertem Serum nicht als eine Rückbildung zu β-Proferment aufgefaßt werden kann.

Fuld (a. a. O.) scheint der Ansicht zu sein, daß das β-Proferment eine stabilere Phase des Thrombins sei, in die dasselbe bei längerem Stehen des Serums übergeht. Ebenso soll nach ihm auch aktiviertes β-Proferment wieder in den stabilen, unwirk-

samen Zustand übergehen. Gegen diese recht bestechende Ansicht sprechen jedoch einige der oben angeführten Tatsachen:

1. Läßt sich frisches Serum ebenso gut aktivieren wie altes.
2. Läßt sich Serum nicht beliebig oft reaktivieren.
3. Läßt sich Schmidts Thrombin, wenn einmal unwirksam geworden, nicht reaktivieren.

Immerhin muß zugegeben werden, daß die angeführten Versuche nicht genügen um Fulds Anschauung ganz zu entkräften.

Trotz seiner großen Resistenz gegen verschiedene Einflüsse ist das β-Proferment thermolabil und wird in gleicher Weise wie α-Proferment und Thrombin selbst durch $^1/_2$ stündiges Erwärmen auf 60 bis 62° zerstört. Durch Dialyse läßt es sich nicht entfernen und fällt beim Aussalzen des Serums mit Ammonsulfat mit den Globulinen zwischen 30 und 50 Proz. Ammonsulfatsättigung aus. Eine genauere Trennung des Thrombins und β-Profermentes durch Aussalzen mit Ammonsulfat wurde vergebens angestrebt, da das Ferment bei dieser Methode scheinbar stark geschädigt wird, und selbst ein geringer Gehalt an Ammonsulfat in der Fibrinogenlösung die Gerinnung zu beeinflussen scheint, jedenfalls die Sicherheit der Resultate vermindert. Während Alkalizusatz die Entstehung von Thrombin aus dem β-Proferment ermöglicht, zerstört längere Einwirkung des Alkalis das gebildete β-Ferment vollständig, falls nicht rechtzeitig neutralisiert wird. Schon dreistündige Einwirkung von $^n/_{20}$ NaOH bei 35° genügen, um das gebildete Thrombin zu zerstören, so daß das Serum nach Neutralisierung unwirksam ist. In diesem Falle gelingt es auch nicht, das Serum nochmals zu aktivieren.

In einer Lösung von Schmidtschem Thrombin war kein β-Proferment nachweisbar. Diese Erscheinung, die schon Schmidt bekannt war, ist um so auffallender, als Schmidts Thrombin bekanntlich aus durch Alkohol koaguliertem und getrocknetem Serum hergestellt wird. Schmidt nahm an, daß bei der Alkoholbehandlung das Proferment (= β-Proferment) zerstört würde. Er mußte diese Annahme machen, weil er glaubte, daß β-Proferment im Blute präformiert enthalten sei. Ließ er nun Blut direkt aus dem Gefäß in Alkohol laufen, so konnte er nachträglich im Koagulum weder Ferment noch Proferment nachweisen. Da letzteres nach seiner Ansicht vorhanden gewesen war, mußte es zerstört worden sein.

Auch diesen Ausführungen kann ich mich nicht anschließen. Denn einmal ist es schon a priori wenig wahrscheinlich, daß das Thrombin durch die Alkoholbehandlung weniger angegriffen

wird als das sonst viel widerstandsfähigere β-Proferment. Dann aber zeigt auch der quantitative Versuch, daß man nicht von einer Zerstörung, sondern, wenigstens in dem von mir untersuchten Fall, von einer Aktivierung des β-Profermentes durch die Alkoholbehandlung reden muß.

Versuch:

0,75 g des trockenen, durch Koagulation von Rinderserum mit Alkohol gewonnenen Pulvers werden in 20 ccm Kochsalzlösung suspendiert und $^1/_2$ Stunde bei 30° extrahiert.

0,75 g Eiweiß sind etwa in 10 ccm Serum enthalten. Da ich mit 20 ccm Kochsalzlösung extrahiert habe, sollte man erwarten, daß, falls die Extraktion vollständig war, die fermentative Wirkung dieses Extraktes nur halb so groß sein wird, als die der gleichen Menge frischen Rinderserums.

1. 20 Tropfen frischen Rinderserums + 10 ccm Fibrinogen in einer Stunde geronnen.

2. 20 Tropfen des Extraktes + 10 ccm Fibrinogen in zehn Minuten geronnen.

Man sieht, daß ganz wider Erwarten die Wirkung des Extraktes sechsmal (eigentlich zwölfmal) stärker ist als die des frischen Rinderserums. Selbst wenn man große individuelle Abweichungen im Fermentgehalt des frischen Serums mit Recht annehmen darf, so weisen doch so enorme Differenzen darauf hin, daß durch die Alkoholbehandlung β-Proferment aktiviert worden ist, also neben α- auch β-Ferment vorhanden ist, falls nicht andere, noch unbekannte Faktoren mitspielen. In diesem Sinne würde auch der Umstand sprechen, daß der Fermentgehalt einer Schmidtschen Fermentlösung ungefähr ebenso schnell absinkt, als der des aktivierten Serums, also viel schneller als der Gehalt an α-Ferment in gewöhnlichem Serum.

5. Die Abstammung des β-Profermentes.

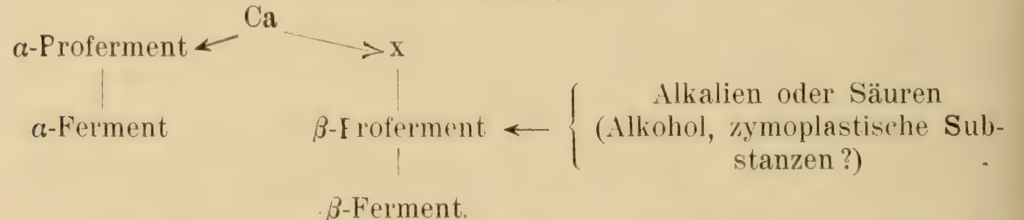
Da sich, wie oben hervorgehoben, im Oxalat- und Fluoridblut kein β-Proferment nachweisen läßt, da es ferner sofort nach der Gerinnung im Serum in reichlicher Menge vorhanden ist, kann man seine Entstehung wohl mit Sicherheit mit dem Vorgang der Gerinnung in Zusammenhang bringen. Bei der normalen Gerinnung entsteht neben α-Ferment eine große Menge β-Proferment.

Es fragt sich, ob dieses β-Proferment 1. durch Ca-Einfluß entsteht, ebenso wie das α-Ferment, und 2. ob sich dann Anhaltspunkte dafür finden lassen, daß es mit dem α-Proferment in irgend einem genetischen Zusammenhange steht, etwa als Abkömmling des α-Profermentes betrachtet werden kann.

Die erste Frage ist leicht in bejahendem Sinne zu beantworten: fügt man zu verdünntem Oxalatblut eine hinreichende

Menge von Schmidtschem Ferment, das 0,1 Proz. Ammonoxalat enthält, so erfolgt natürlich Gerinnung ohne Mitwirkung von Ca-Ionen. Das auf diese Weise gewonnene Serum erweist sich als unwirksam, worüber man sich nicht wundern darf, da einmal bei dieser Art der Koagulation aus dem im Oxalatplasma vorhandenen α-Proferment wegen der Abwesenheit der Kalksalze sich kein Ferment bilden kann, und weiterhin das zugesetzte Schmidtsche Ferment sehr stark verdünnt ist, ferner aber auch, namentlich bei Brutschranktemperatur, sehr schnell an Wirkungswert einbüßt, endlich zum Teil dem entfernten Fibrin anhaftet. Das so gewonnene unwirksame Serum enthält nun kein aktivierbares β-Proferment, womit gezeigt ist, daß die Bildung des β-Profermentes nicht unbedingt mit dem Vorgang der Gerinnung zusammenhängt, sondern vielleicht auch von der Gegenwart der Kalksalze abhängig ist.

Auf Grund dieses Versuches können wir uns die Vorstellung bilden, daß bei der Gerinnung normalerweise unter dem Einfluß der Ca-Ionen ebenso wie aus α-Proferment das α-Ferment, so aus irgend einer unbekannten Vorstufe x β-Proferment abgespalten wird.



Diese Vorstellung greift den Tatsachen nicht vor, befriedigt aber insofern weniger, als man eine doppelte Wirkung des Ca, ferner zwei verschiedene Fermentvorstufen annehmen muß.

Viel einfacher würde sich das Schema gestalten, wenn es gelänge, einen genetischen Zusammenhang zwischen α- und β-Proferment zu finden. Ein sicherer Beweis läßt sich vorerst dafür nicht geben, wohl aber ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß. Denn beides sind Thrombine, die in gleicher Weise wirken, beide sind thermolabil. Am sichersten würde für die Identität die Übereinstimmung des Zeit- und Verdünnungsgesetzes sprechen; doch scheitert ein derartiger Versuch leider an den in der Einleitung berührten Schwierigkeiten. Dagegen gelingt es, auf anderem Wege eine weitere Stütze für die Identität des α- und β-Fermentes beizubringen, da sich nämlich zeigen läßt, daß beide durch gerinnungshemmende Körper, die man als Antithrombine bezeichnen kann, in der gleichen Weise in ihrer Wirkung beeinträchtigt werden.

IV.

Nachweis eines Antithrombins.

Bisher war nicht versucht worden, eine nähere Vorstellung über das Wesen der Alkali-Säureaktivierung zu entwickeln. Wenn man auch über den zugrunde liegenden Vorgang die verschiedensten Anschauungen haben kann, so lag doch die Vorstellung, daß dabei die Wirkung eines die Fermentwirkung

hemmenden Antikörpers aufgehoben werde, besonders nahe, eine Vorstellung, für die übrigens die weitere Untersuchung keine Anhaltspunkte beibringen konnte.

Für eine solche Vorstellung sprachen die Angaben über Antithrombine verschiedener Art, die sich in letzter Zeit häufen. Daß in der Tat der tierische Organismus spezifische gerinnungshemmende Substanzen erzeugen kann, darf als sichergestellt angesehen werden. Dafür sprechen die sehr zahlreichen Beobachtungen einer verminderten Gerinnbarkeit nach Injektionen von Thrombin oder Gewebsfibrinogen, wobei der positiven Phase stets eine negative folgt*). Noch greifbarer und sicherer treten uns Antithrombine, welche die Eigentümlichkeit zeigen, hitzebeständig zu sein, im Pepton- und Blutegelextraktplasma entgegen**). Endlich ist es in neuester Zeit Bordet und Gengou***) sowie Camus†) gelungen, durch Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Kaninchenserum spezifische Antithrombine gegen Kaninchenferment zu erzeugen.

Jedoch lagen noch keine Beobachtungen vor, die auch im normalen Blut oder Serum die Anwesenheit eines Antithrombins bewiesen hätten. Zwar hatte schon Alexander Schmidt die Notwendigkeit eines gerinnungshemmenden Körpers für die Erhaltung des flüssigen Zustands des Blutes erkannt, eines Körpers, der imstande wäre, geringe Mengen von Thrombin zu neutralisieren. Doch hat weder Schmidts Cytoglobin nach Lilienfelds††) Histon in dieser Richtung Anerkennung gefunden. Was endlich das neuerdings von Conradi†††) bei der Autolyse der Leber gefundene Antithrombin anlangt, so gibt dieser Autor selbst zu, dasselbe im Blute nicht gefunden zu haben.

Dagegen finden sich andere Angaben, die für eine gerinnungshemmende Wirkung des Blutes zu sprechen scheinen. Schmidt*†)

*) Jakowicky, Zur physiologischen Wirkung der Bluttransfusion. I.-D. Dorpat 1875. — Köhler, Über Thrombose und Transfusion etc. I.-D. Dorpat 1877. — Edelberg, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 12, 283. — v. Rennenkampf, Über die in Folge intravasc. Injektion von Cytoglobin auftretenden Blutveränderungen. I.-D. Dorpat 1891. — Groth, Über die Schicksale der farblosen Elemente im kreisenden Blute. I.-D. Dorpat 1884. — Wooldridge, a. a. O.

**) Delezenne, Travaux du Laboratoire de physiol. Montpellier. 1898. 213 u. 284.

***) Ann. de l'Inst. Pasteur 15, 129 (1901).

†) C. R. de l'Acad. des Sciences 1901.

††) a. a. O.

†††) Diese Beiträge 1, 136.

*†) Pflügers Arch. 6, 451.

fand, daß manche Transsudate, trotzdem sie Fibrinogen enthalten, auf Zusatz von Ferment nur sehr unvollkommen oder gar nicht gerinnen, eine Beobachtung, die Schmidt auf das Fehlen der fibrinoplastischen Substanz zurückführt. Ähnliche Erfahrungen machte Hammarsten*) an Hydrokeleflüssigkeiten, die auf Zusatz von Ferment nicht gerannen, während das aus solcher Flüssigkeit hergestellte Fibrinogen sehr schnell zum Gerinnen gebracht wird. Wichtiger noch sind einige Bemerkungen Hammarstens**) über die Gerinnung des Oxalatplasmas auf Fermentzusatz. Er fand nämlich, daß 0,3 proz. Oxalatplasma auf Zusatz geringer Fermentmengen tagelang flüssig bleiben kann, während stärker wirksames Thrombin es in kurzer Zeit zur Koagulation bringt. Hammarsten bezieht dieses Verhalten auf den Oxalatgehalt des Plasmas. Jedoch scheint eine derartige Auffassung nicht ganz einwandsfrei, da man sich schlecht vorstellen kann, warum der Oxalatgehalt geringe Fermentmengen gar nicht zur Wirkung gelangen läßt, während größere trotz des hindernden Salzgehaltes sehr prompte Koagulation hervorrufen, wovon man sich leicht überzeugen kann. Endlich sei hier noch eine Bemerkung desselben Autors angeführt. Hammarsten (a. a. O.) sagt nämlich, daß er bei Gerinnungsversuchen mit 0,1 proz. Oxalatplasma bald eine Verzögerung gegenüber einer Fibrinogenlösung gesehen habe, bald aber gar keine hemmende Wirkung des Oxalatgehaltes.

Diese Bemerkungen wiesen darauf hin, den gerinnungshemmenden Körper zunächst im Oxalatplasma zu suchen.

1. Nachweis eines gerinnungshemmenden Körpers im Oxalatplasma.

Die Schwergerinnbarkeit des Oxalatblutes wurde bisher immer auf dessen Oxalatgehalt bezogen, und es kann in der Tat keinem Zweifel unterliegen, daß ein Oxalatgehalt von 0,4 bis 0,5 Proz. die Gerinnung ganz wesentlich verzögern kann.

Auch in verdünntem Oxalatplasma, das nur 0,1 Proz. Ammonoxalat enthält, beobachtet man fast regelmäßig eine Hemmung des Gerinnungsvorganges. Es fragt sich, ob diese Erscheinung ebenfalls ausschließlich oder doch wenigstens vorwiegend vom Salzgehalt abhängig ist.

Zur Entscheidung der Frage wurden sehr zahlreiche Versuche angestellt, die stets das gleiche Resultat ergaben. Es mag daher genügen, ein Experiment mitzuteilen.

---

*) Pflüg. Arch. 19, 603.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 22.

Versuch:

Serum, aktiviert	Frisches Oxalatplasma	Ammonoxalatlösung	Fibrinogen	Oxalatkonzentration	Temp.	Zeitpunkt der Gerinnung
10 Tropf.	5 ccm	—	15 ccm	etwa 0,09 Proz.	20°	nach 9 Stdn. nicht geronnen
do.	—	5 ccm 0,5 Proz.	do.	etwa 0,125 Proz.	do.	1½ Stdn.
do.	—	5 ccm 0,75 Proz.	do.	etwa 0,19 Proz.	do.	1½ Stdn.
do.	—	5 ccm 1 Proz.	do.	etwa 0,25 Proz.	do.	1½ Stdn.

Es zeigt dieser Versuch, daß die gerinnungshemmende Wirkung frischen Oxalatplasmas weder ausschließlich, noch auch zum größten Teil auf dessen Oxalatgehalt zurückgeführt werden kann. Es fragt sich, ob man es mit einer spezifischen Hemmungswirkung im Sinne eines Antikörpers oder mit irgend welchen auf physikalische Weise gerinnungshemmend wirkenden Faktoren zu tun hat. Dabei wäre z. B. an eine Kolloidwirkung zu denken, da man schon seit Johannes Müller weiß, daß Kolloide die Gerinnung verzögern können. Nun ist es schon von vornherein sehr unwahrscheinlich, daß Blutplasma, eine Flüssigkeit, die normalerweise gerinnt, bei einer Verdünnung auf das Vierfache durch seinen Kolloidgehalt die Gerinnung verzögern oder aufheben sollte. Durch weitere Versuche kann auch dieser Einwand ausgeschlossen werden.

Die gerinnungshemmende Wirkung des Oxalatplasmas scheint nämlich im frischen Plasma am stärksten zu sein und beim Stehen allmählich abzunehmen. Alle die Faktoren, die, wie oben ausgeführt, das Unwirksamwerden des Fermentes im Serum veranlassen, wirken auch hier in dem gleichen Sinne. Je länger Oxalatplasma, namentlich bei etwas höherer Temperatur aufbewahrt wird, durch um so kleinere Fermentmengen läßt es sich zur Gerinnung bringen.

Versuch:

Serum, frisch	Oxalatplasma	Fibrinogen	Temperatur	Geronnen nach
10 Tropfen nicht aktiv	5 ccm 5 Tage alt	15 ccm	35°	3 St. 40 Min.
do.	5 ccm frisch	15 ccm	do.	nach 24 Std. ungeronnen
do.	—	20 ccm	do.	1 St. 15 Min.

Da nicht anzunehmen ist, daß die physikalischen Bedingungen im Plasma, die imstande sind, die Gerinnung zu verzögern, sich in einer so kurzen Zeit in dieser Weise verändern, muß man in erster Linie an eine spezifische Hemmungswirkung denken.

Daneben habe ich noch einige Versuche mit Kolloiden angestellt, um zu sehen, ob dieselben in einer Konzentration, wie sie im Plasma vorhanden ist, die Gerinnung wesentlich verzögern können. Geprüft wurden Eierklar, Milch*), Dextrin und käufliches Eialbumin. In keinem Falle war eine bemerkbare Verzögerung der Gerinnung nachweisbar.

Um entscheiden zu können, ob diese Hemmungswirkung als Wirkung eines Antithrombins aufzufassen ist, mußte untersucht werden, ob gleiche Mengen des Antikörpers stets gleiche Mengen Ferment neutralisieren können, ob also hier einfache Proportionalität besteht. Das ist in der Tat der Fall, soweit sich bei der unvollkommenen Methodik Schlüsse ziehen lassen.

Versuch 1:

Oxalatplasma, 3 Tage alt	Serum, frisch, nicht-aktiviert	Kochsalzlösung 0,9 Proz.	Oxalatgehalt	Temp.	Zeitpunkt der Gerinnung
5 ccm	1 Tropfen	5 ccm	etwa 0,15 Proz.	35°	nach 36 Stdn. ungeronnen
do.	2 „	do.	do.	do.	do.
do.	5 „	do.	do.	do.	15 Stdn.
do.	10 „	do.	do.	do.	15 Stdn.

Versuch 2:

Oxalatplasma, 3 Tage alt	Serum, frisch	Fibrinogen	Oxalat-konzentration	Temp.	Zeitpunkt der Gerinnung
5 ccm	1 Tropfen	10 ccm	etwa 0,1 Proz.	35°	ungeronnen n. 60 Stdn.
do.	2 „	do.	etwa 0,1 Proz.	do.	ungeronnen n. 60 Stdn.
do.	5 „	—	etwa 0,3 Proz.	do.	n. 12 Stdn. partielle Gerinnung
do.	10 „	—	etwa 0,3 Proz.	do.	n. 12 Stdn. z. größten Teil geronnen**)

*) Camus, C. R. Soc. de Biol. **53**, 843.

**) Diese partiellen, nur langsam fortschreitenden Gerinnungen haben eine schleimige Beschaffenheit, was schon von Hammarsten auf die Gegenwart von Oxalaten bezogen worden ist.

Während diese mit älterem Oxalatplasma ausgeführten Versuche nur eine relativ schwache Antiwirkung erkennen lassen, ändert sich das Verhältnis sofort bei Verwendung frischen Oxalatplasmas.

Oxalatplasma, frisch	Serum, frisch	Fibrinogen	Temp.	Zeitpunkt der Gerinnung	Dauer des Versuchs
5 ccm	5 Tropfen	10 ccm	35°	nach 40 Stdn. nicht geronnen	40 Stdn.
do.	10 „	do.	do.	do.	
do.	15 „	do.	do.	do.	
do.	20 „	do.	do.	nach 40 Stdn. geronnen	
do.	30 „	do.	do.	nach 20 Stdn. geronnen	

Aus zahlreichen Versuchen, die mit frischem Oxalatplasma und frischem oder aktiviertem Serum angestellt wurden, ergab sich, daß Oxalatplasma im günstigsten Falle etwa $^1/_2$ bis $^3/_4$ seines Volumens an frischem, inaktivem, kalkfreiem Serum zu neutralisieren vermag, d. h. die Gerinnung innerhalb zwölf Stunden bei 35° verhindern kann.

Daraus darf mit gewissen Einschränkungen der Schluß gezogen werden, daß der Antikörper einen relativ großen Prozentsatz des bei der Gerinnung entstehenden Thrombins zu neutralisieren vermag.

Da der Antikörper allmählich unwirksam wird, könnte man erwarten, daß dabei diese gebundene Fermentmenge wieder frei und im Serum nachweisbar wird. Auch dafür haben wir Anhaltspunkte in dem verschiedenen Verhalten, das α- und β-Ferment schädigenden äußeren Einflüssen gegenüber zeigen. α-Ferment wird, wie oben gezeigt wurde, viel langsamer unwirksam als β-Ferment oder Schmidts Thrombin, woraus auf eine Verschiedenheit der Fermente geschlossen werden könnte.

Nun läßt sich aber mit Hilfe der Antikörperversuche recht wahrscheinlich machen, daß α- und β-Ferment identisch sind. Denn der Antikörper wirkt in gleicher Weise auf α- und β-Ferment ein. (Siehe Versuch auf folgender Seite.)

Bei diesem Versuch war die Fermentmenge im frischen Serum größer als im 20fach verdünnten aktivierten Serum. Dementsprechend gerann sowohl die mit Oxalatplasma, als auch die

mit einer Fibrinogenlösung beschickte Probe früher als die entsprechenden Proben mit aktiviertem Serum.

Daraus darf geschlossen werden, daß der Antikörper in der gleichen Weise auf α- und β-Ferment wirkt. Die Spezifizität der Antikörperwirkung legt dann die Möglichkeit nahe, daß α- und β-Ferment, die sich ja auch in ihrem Verhalten und ihrer Wirkung nicht unterscheiden, identisch sein können.

Versuch:

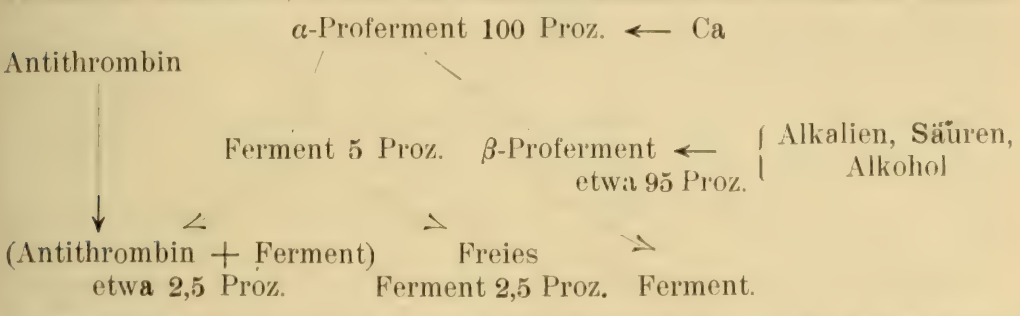
Oxalatplasma	Serum, frisch	Menge des Serums	Fibrinogen	Temp.	Geronnen nach
5 ccm	aktiv, 20 fach verdünnt	10 Tropfen	10 ccm	35°	etwa $9^1/_2$ St.
—	do.	do.	15 ccm	do.	1 St. 55 M.
5 ccm	nicht aktiv, unverdünnt	do.	10 ccm	do.	5 St. 20 M.
—	do.	do.	15 ccm	do.	1 St. 10 M.

Wenn nun β-Ferment unter den gleichen Bedingungen schneller aus dem Serum verschwindet als α-Ferment, so könnte man sich darüber etwa die Vorstellung bilden, daß α-Ferment im Serum zum Teil in Form eines widerstandsfähigen, unwirksamen Thrombin-Antithrombinkomplexes vorhanden sei und durch Zerfall des Antikörpers langsam aus dieser Form in Freiheit gesetzt werde. Die freien α-Fermentmoleküle gingen dann ebenso schnell zugrunde wie das β-Ferment. Die freien Fermentmoleküle wären dann also sehr kurzlebig. In diesem Sinne wäre auch z. B. vielleicht der Umstand zu deuten, daß der Gehalt des Serums an α-Ferment zunächst rapid, dann nur langsam absinkt. Ist der Antikörper ganz zugrunde gegangen, so wird das Serum bald völlig unwirksam werden, da das freigewordene Ferment sich nur kurze Zeit wirksam hält. Dieses unwirksame Serum enthält aber noch große Mengen β-Proferment. Daher darf man nicht annehmen, daß β-Proferment ebenfalls nur aus dem Komplex Antikörper und Ferment besteht, wogegen auch schon die relativ geringe Menge des Antikörpers im frischen Oxalatplasma spricht. Im andern Falle müßte dasselbe annähernd die gleiche Menge maximal aktivierten Oxalatplasmas neutralisieren können, was auch nicht im entferntesten zutrifft.

Über die Natur des β-Profermentes gibt der Nachweis des Antikörpers keinen Aufschluß. Vielleicht sind Thrombin und β-Proferment nicht chemisch, sondern nur physikalisch-chemisch different, wie Fuld bereits vermutet. Nur insofern kann ich der Fuldschen Auffassung nicht beistimmen, als sich aus meinen Versuchen kein Anhaltspunkt dafür ergab, daß β-Ferment oder α-Ferment wieder in β-Proferment übergehen kann. Mir scheint vielmehr das freie Ferment definitiv unwirksam zu werden.

Die Identität des α- und β-Ferments und der genetische Zusammenhang zwischen α- und β-Proferment können zwar durch die vorhergehenden Versuche keineswegs als erwiesen angesehen werden, gewinnen aber doch an Wahrscheinlichkeit.

Graphisch würde man die bei der Gerinnung auftretenden Veränderungen in diesem Sinne etwa folgendermaßen ausdrücken können, indem man durch Hinzufügung der Prozentzahlen ungefähr das Mengenverhältnis ausdrückt, in dem die einzelnen Bestandteile zueinander stehen.



2. Charakterisierung des Antithrombins und Nachweis desselben im Fluoridblut und im Serum.

Das im Oxalatplasma gefundene Antithrombin zeigt im wesentlichen die Eigenschaften des von Bordet hergestellten Antikörpers, nicht aber die der Antikörper im Pepton- und Blutegelplasma.

a) Dialyse. Nach 24stündiger Dialyse im Pergamentschlauch ist die Antiwirkung deutlich erkennbar, wenn man das ausgefallene Globulin wieder durch Salzzusatz auflöst. Das Fibrinogen ist dabei zum großen Teil unlöslich geworden. Der Versuch zeigt, daß der Antikörper nicht mit dem Fibrinogen ausfällt.

b) Hitzebeständigkeit. Der Antikörper wird durch viertelstündiges Erwärmen auf 60° in seiner Wirkung geschädigt. Dieser Versuch ist an Plasma zu machen, das durch Dialyse von seinem Fibrinogengehalt möglichst befreit ist, da das Fibrinogen schon bei 56° koaguliert.

c) Verhalten gegen Alkalien und Säuren. Alkalien und Säuren, die genau in der gleichen Weise wie beim Aktivieren des Serums angewandt wurden, schädigen ebenfalls den Antikörper.

Versuch:

Oxalatplasma, frisch	Aktiviert	mit 0,9 NaCl. Lös. verdünnt	Serum, aktiviertes	Geronnen nach
5 ccm	mit NaOH	—	10 Tropfen	2 St.
do.	mit H_2SO_4	—	do.	2 St.
do.	—	auf das 3fache	do.	nach 7 St. noch flüssig

In den aktivierten Proben trat anfangs eine flockige Ausscheidung des Fibrinogens und dann erst typische Gerinnung auf. Offenbar wird auch das Fibrinogen durch diese Behandlungsmethode verändert. Ohne Fermentzusatz erhält man keine flockige Ausscheidung im aktivierten Plasma.

Bisher wurde das Antithrombin nur im Oxalatplasma gefunden. Da das Oxalatplasma α-Proferment enthält, wäre die Annahme möglich, daß der Antikörper zugleich mit dem Proferment gebildet wird, bzw. in das Plasma übertritt und für die Erhaltung des flüssigen Zustandes des Blutes in vivo ohne Bedeutung ist. Man wird daher suchen müssen, den Antikörper in einem Plasma nachzuweisen, das von α-Proferment frei ist. Ein solches Plasma bietet sich uns in dem Fluoridplasma nach Arthus*), das im Gegensatz zum Oxalatplasma auf Ca-Zusatz nicht gerinnt. In der Tat zeigte das Fluoridplasma vom Hunde regelmäßig gerinnungshemmende Eigenschaften: Setzt man Hundeserum zum Fluoridplasma, so tritt meist sehr bald eine flockige Fällung auf, die je nach der Menge des zugesetzten Serums verschieden reichlich ist. Diese Gerinnungen bleiben vollkommen stationär, selbst wenn man die Proben 24 Stunden bei 35° hält. Erst Zusatz stark wirksamen Ferments führt dann in kurzer Zeit die Gerinnung herbei. Daß auch bei diesen Versuchen natürlich Kontrollproben mit fluorhaltiger Fibrinogenlösung ausgeführt wurden, die sämtlich prompt gerannen, braucht kaum erwähnt zu werden. Möglicherweise ist die Beobachtung von Arthus, daß geringe Serummengen im Fluoridplasma umschriebene, stationäre Gerinnungen erzeugen, mit dem eben erwähnten Befund in Zusammenhang zu bringen. Auch das Peptonplasma, das bekanntlich ein Antithrombin enthält, neigt außerordentlich zu partiellen Gerinnungen.

Man kann sich vorstellen, daß das Ferment, solange es durch den Antikörper noch nicht unwirksam gemacht worden ist, eine partielle Gerinnung hervorrufen kann. Warum diese Erscheinung im Oxalatplasma nicht zu bemerken ist, kann man nicht sicher sagen. Vielleicht spielt hierbei der Oxalatgehalt eine Rolle, da ich das unverdünnte 0,3 bis 0,4 proz. Oxalatplasma stets eine halbe Stunde der Einwirkung des Serums aussetzte, bevor dasselbe durch Zusatz von Fibrinogen verdünnt wurde. Das Natriumfluorid verzögert in einer Konzentration von 0,3 Proz. die Gerinnung überhaupt nicht merklich.

Diese Versuche am Fluoridplasma weisen mit Wahrscheinlichkeit auf die Präexistenz eines gerinnungs-

*) a. a. O.

hemmenden Körpers im zirkulierenden Blute hin und damit zugleich auf seine Bedeutung für den flüssigen Zustand desselben.

Daneben boten mir Versuche am Fluorplasma des Pferdes Gelegenheit, eine andre Eigenschaft des Antikörpers festzustellen, nämlich seine Fällbarkeit mit den Globulinen. Bei einem Versuch aus Fluoridplasma, das auf Ca-Zusatz nicht gerann, mit Hilfe der Salzfällungsmethode Fibrinogen herzustellen, zeigte es sich, daß zwar die durch Ganzsättigung mit Kochsalz erhaltene Fällung mit Ca keine Koagulation gab, wohl aber die durch Halbsättigung erhaltene Fällung, die außer dem Fibrinogen keine Globuline mehr enthielt. Es scheint, daß hier die Anwesenheit der Globuline hemmend gewirkt hat, wodurch sich diese Beobachtung den im technischen Teil erwähnten gelegentlichen Gerinnungen in Fibrinogenlösungen anreiht.

Auffallenderweise kommt nun auch dem Serum eine gerinnungshemmende Kraft zu. Versetzt man aktiviertes Serum mit nicht aktiviertem, frischem und gut wirksamem Serum, so wird die Gerinnungszeit gegenüber aktiviertem Serum allein ganz wesentlich verlängert.

Versuch:

Serum, aktiv.	Serum, frisch, inakt.	0,8 Proz. NaCl	Einwirkungsdauer	Dann Fibrinogen	Geronnen nach
10 Tropfen	1 ccm	—	$^1/_2$ Std.	10 ccm.	3—4 Std.
10 Tropfen	—	1 ccm	do.	do.	15 Min.

Diese Verzögerung ist zwar, soweit ich gesehen habe, nie so stark wie die durch Zusatz von Plasma hervorgerufene, sie ist aber in allen Fällen deutlich vorhanden.

Eine Erklärung dieser scheinbar so paradoxen Erscheinung ist nicht leicht zu geben. Wir setzen zu einer geringen Menge starker Fermentlösung (aktiviertes Serum) eine gewisse Menge Ferment (nichtaktiviertes Serum) hinzu. Statt der erwarteten Gerinnungsbeschleunigung beobachten wir regelmäßig eine ganz wesentliche Verzögerung des Gerinnungsvorganges.

Man konnte zunächst versucht sein, diese Erscheinung auf physikalische Momente, wie Kolloid- oder Alkaliwirkung des zugesetzten Serums, zu beziehen, doch finden sich dafür absolut keine Anhaltspunkte. Ebensowenig kann man annehmen, daß der im Serum angenommene Komplex Thrombin-Antithrombin hierbei der wirksame Faktor sei. Denn da im unaktivierten Serum das Antithrombin vollständig gesättigt sein müßte, da ja freies Ferment vorhanden ist, kann man, sofern man die Vorstellungen Ehrlichs über das Verhältnis von Antitoxin und Toxin auf

unseren Fall übertragen will, keinen Grund für eine Abschwächung der Wirksamkeit des aktivierten Serums finden.

Eine gewisse Analogie in der oben beschriebenen Erscheinung bieten einige Tatsachen, die ganz kürzlich von Gruber*) sehr energisch hervorgehoben und zu einem Angriff gegen Ehrlichs Auffassung benutzt worden sind: fügt man nämlich zu einem neutralisierten Gemisch von Toxin-Antitoxin neues Toxin hinzu, so wird dessen Wirkung abgeschwächt. Diese Erscheinung kann für den vorliegenden Fall und seine theoretische Deutung wichtig sein, besonders da oben versucht worden ist, zu zeigen, daß man inaktives Serum bis zu einem gewissen Grade als Ferment-Antifermentgemisch auffassen kann, da die Menge des freien Fermentes sehr geringfügig ist.

Mag es nun auch verfrüht sein, die Erklärung Grubers auf diesen Fall zu übertragen, so ist jedenfalls soviel sicher, daß durch Hinzufügen von Serum zu aktiviertem Serum sich ein neuer Gleichgewichtszustand herstellt, der zu einer Verminderung der freien Fermentmoleküle führt.

Daß in der Tat dem Antikörper eine gewisse Rolle bei diesen Vorgängen zuzufallen scheint, macht die Abschwächung der gerinnungshemmenden Kraft des Serums durch Erhitzen oder längeres Stehen wahrscheinlich.

Altes und erhitztes Serum wirken, trotzdem sie wenig oder kein α-Ferment enthalten, schwächer hemmend auf aktiviertes Serum als frisches Serum. Zwei in diesem Sinne angestellte Versuchsreihen ergaben durchaus gleiche Resultate.

Versuch:

Serum, aktiv.		Fibrinogen	Temp.	Geronnen nach
10 Tropfen	5 ccm Kochsalzlösung	15 ccm	35°	20 Min.
do.	5 ccm Serum, frisch, nicht aktiv.	do.	do.	2¹/₂ St.
do.	5 ccm Serum, ¹/₄ St. auf 60° erhitzt	do.	do.	etwa 1 St.
do.	5 ccm Serum, aktiv., dann erhitzt	do.	do.	etwa 1 St.
do.	5 ccm Serum, 5 Tage alt	do.	do.	etwa 1 St.

V.

Vergleich der gefundenen Resultate mit Schmidts Gerinnungstheorie.

Die mitgeteilten Tatsachen reichen allerdings nicht hin, eine neue Gerinnungstheorie aufzustellen, sie scheinen aber doch ge-

*) Gruber und von Pirquet, Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 28 und 29.

eignet zu sein, auf einzelne Punkte ein klareres Licht zu werfen und manche Mißverständnisse zu beseitigen.

Die Beobachtungen Alexander Schmidts konnten so häufig bestätigt werden, daß sich der Gedanke aufdrängt, ob nicht Schmidts Gerinnungstheorie, besonders die Lehre von den zymoplastischen Substanzen, wie sie in der Einleitung kurz skizziert wurde, doch mehr Berechtigung hat, als man bisher anzunehmen geneigt war, und nur deswegen verlassen wurde, weil Schmidt dem Ca gar keine Rolle bei der Bildung des Fermentes zuerkennen wollte.

Falls man annimmt, daß dem Organismus gar kein Mittel zu Gebote steht, β-Proferment in β-Ferment überzuführen, so ist eine Bedeutung des in so großen Mengen vorhandenen β-Profermentes für die Gerinnung nicht zu ersehen, β-Proferment wäre dann ein Reservestoff für Thrombin, der nie in Aktion treten könnte.

Das war schon Alexander Schmidt, der ja bereits die Aktivierung durch Alkali kannte, aufgefallen, und teilweise mag er diesem Gedanken gefolgt sein, als er annahm, daß die Alkalien nur dadurch wirksam sind, daß sie die Einwirkung der zymoplastischen Substanzen auf das β-Proferment begünstigen. Fehlen zymoplastische Substanzen, so ist auch Alkalieinwirkung ohne Einfluß.

Wenn man die Gerinnung von der Einwirkung zweier verschiedener Faktoren, des β-Prothrombins und der zymoplastischen Substanzen aufeinander oder der gleichzeitigen Einwirkung derselben auf das Fibrinogen abhängig macht, werden die Verhältnisse im einzelnen Falle sehr undurchsichtig und verwickelt. Deswegen habe ich vorerst die von Schmidt angenommene Bildung von Thrombin aus β-Proferment unter Einwirkung zymoplastischer Substanzen außer acht gelassen.

Nun ist aber nicht zu leugnen, daß neben den Beobachtungen Schmidts auch die zahlreicher neuerer Autoren mit großer Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Substanzen sprechen, die die Blutgerinnung auslösen oder beschleunigen (Wooldridges*) Gewebsfibrinogene).

Dabei muß freilich bemerkt werden, daß die Resultate verschiedener Untersucher sich bisher miteinander nicht völlig in Einklang bringen lassen: nach Foà und Pellacani**),

*) a. a. O.

**) Archiv. p. le Scienze med. 7, 113.

Rauschenbach*) und Huiskamp**) kann man aus den verschiedensten Geweben, besonders aus nukleinreichen, Fibrinferment bzw. α-Proferment durch Wasserextraktion gewinnen. Nach Schmidt enthalten die Gewebe, wenn ich recht verstanden habe, kein Fibrinferment, sondern alkohollösliche, gerinnungsbefördernde und alkoholunlösliche, gerinnungshemmende Substanzen. Conradi (a. a. O.) konnte aus Lymphdrüsenpreßsäften gerinnungsbeschleunigende, durch Wasserextraktion erhältliche Substanzen, deren Wirkung durch Zusatz von Ammonoxalat aufgehoben wurde, gewinnen. Endlich hat in neuester Zeit Hewlett***) durch Extraktion von Leberbrei mit Wasser eine ferment- und profermentfreie Flüssigkeit erhalten, die Peptonblut in ausgezeichneter Weise zur Gerinnung brachte und die Gerinnung des Gesamtblutes beförderte.

Die Existenz des β-Profermentes würde in diesen Fällen die beschleunigende Wirkung der Extrakte zu erklären vermögen, falls es gelänge, eine Aktivierung desselben durch diese Substanzen festzustellen.

Die bisher von mir in dieser Richtung angestellten Versuche haben zweifellos ergeben, daß es Substanzen gibt, die, ohne Ferment oder Proferment zu enthalten, die Gerinnung ganz wesentlich beschleunigen oder direkt auslösen können.

Jedoch sprechen die bisher gefundenen Tatsachen unbedingt in dem Sinne, daß die zymoplastischen Substanzen auf das α-, nicht auf das β-Proferment wirken. In diesem Punkt konnten also die Angaben Schmidts über die alkohollöslichen Kinasen nicht bestätigt werden.

Während also über die Bedeutung des β-Profermentes völlige Klarheit noch nicht erzielt werden konnte, haben weitere Untersuchungen schon jetzt mit Sicherheit ergeben, daß die Bildung des Fibrinfermentes von der Einwirkung mehrerer Substanzen aufeinander abhängig ist, daß also die Schmidtsche Lehre im Prinzip das Richtige getroffen hat. Auch Hewlett (a. a. O.) hat erst kürzlich vermutungsweise dieselbe Ansicht ausgesprochen.

Diese Versuche, die auch geeignet sind, auf die Wirkung der Ca-Ionen etwas mehr Licht zu werfen, sind noch nicht völlig ab-

---

*) Über die Wechselwirkung zwischen Protoplasma und Blutplasma. I.-D. Dorpat 1883.

) Zeitschr. f. physiol. Chemie **32.

***) Archiv f. exp. Pathol. und Pharmakol. **49**, 319.

geschlossen, so daß ich es mir versagen muß, an dieser Stelle genauer darauf einzugehen. Immerhin möchte ich darauf hinweisen, daß sich hier eine weitgehende Parallele zum Verhalten des Protrypsins und der Enterokinase bietet.

Jedenfalls zeigen uns schon diese kurzen Darlegungen, daß der Blutgerinnungsvorgang ein von viel zahlreicheren Bedingungen abhängiger Prozeß ist, als man bisher anzunehmen geneigt war, ein Vorgang, in dessen Verständnis man nur Schritt für Schritt eindringen kann. Vorzeitige Hypothesen, wie z. B. das Analogisieren der zymoplastischen Substanzen mit den hämolytischen Zwischenkörpern, können nur geeignet sein, noch größere Unklarheit zu schaffen, als sie bisher schon besteht.

Schlußergebnisse.

1. Blutserum enthält ein Zymogen (von mir β-Prothrombin genannt), das nicht durch Kalksalze, wohl aber durch Säuren, Alkalien, Alkohol (zymoplastische Substanzen?) in Fibrinferment übergeführt werden kann. Es ist von dem durch Ca-Ionen aktivierbaren Zymogen, das z. B. im Oxalatplasma vorhanden ist und dem Prothrombin von Arthus und Pekelharing entspricht (von mir α-Prothrombin genannt), durchaus verschieden; das β-Prothrombin entspricht dem Prothrombin A. Schmidts. Aus der Identifizierung beider Prothrombine erklären sich zum großen Teil die Widersprüche in den Angaben A. Schmidts und der späteren Untersucher.

2. Das β-Prothrombin entsteht erst während der Gerinnung. Bei einer Gerinnung ohne Ca-Salze bildet sich kein β-Prothrombin.

3. Bezeichnet man vorläufig das aus α-Prothrombin durch Ca-Einwirkung erhaltene Fibrinferment als α-Thrombin, das aus β-Proferment erhaltene als β-Thrombin, so ergibt sich betreffs ihres Vorkommens:

	α-Thrombin	β-Thrombin	α-Prothrombin	β-Prothrombin
Serum, frisch .	+	—	—	+
Serum, alt . .	—	—	—	+
SchmidtsThrombin	+	+	—	—
Oxalatplasma .	—	—	+	—
Fluoridplasma .	—	—	—	—

4. Sowohl α- als β-Thrombin unterliegen beim Stehen einer Veränderung, durch die sie unwirksam werden, und zwar β-Thrombin viel rascher als α-Thrombin.

5. Oxalat- und Fluoridplasma enthalten einen Körper, der proportional seiner Menge die Wirkung von zugesetztem Ferment verhindert. Das Vorkommen dieses Antithrombins im strömenden Blut ist wahrscheinlich. Es besitzt nicht die Eigenschaften von A. Schmidts Cytoglobin.

XXXI.

Über die Zerstörung des Suprarenins (Adrenalins) im Organismus.

Von Dr. **Gustav Embden,**
Assistent am physiologischen Institut,
und
Privatdozent Dr. **Otto v. Fürth,**
Assistent am physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Bekanntlich ist die durch intravenöse Injektion des wirksamen Bestandteiles der Nebennierenmarksubstanz hervorgerufene Blutdrucksteigerung von nur kurzer Dauer; dieselbe übersteigt, selbst nach Anwendung großer Gaben, nicht den Zeitraum von wenigen Minuten. Während Oliver und Schäfer*) glaubten, das rasche Vorübergehen der Wirkung durch ein schnelles Hinausdiffundieren der wirksamen Substanz aus dem Blute erklären zu können, waren andere Forscher geneigt, diese Erscheinung auf eine rapide Zerstörung der blutdrucksteigernden Substanz im Organismus zu beziehen. Trotzdem Cybulski**) nach Beibringung großer Mengen von Nebennierenextrakt die wirksame Substanz im Harn von Hunden nachweisen konnte, glaubte er aus dem Umstande, daß eine Ausschaltung der Nieren die Dauer der Blutdrucksteigerung nicht erhöht, auf eine schnelle oxydative Zerstörung der gefäßverengernden Verbindung im Organismus schließen zu müssen. „Die Tatsache", schreibt ferner Szymonowicz***), „daß die Wirkung des eingeführten

---

*) Oliver und Schäfer, On the physiological action of extracts of the suprarenal capsules. Proc. of the physiol. Society March 10, 1894. Journ. of physiol. **16**.

**) N. Cybulski, Über die Funktionen der Nebennieren. Gazeta Lekarska 1895, No. 12 (polnisch).

***) L. Szymonowicz, Die Funktion der Nebenniere. Pflügers Archiv **64**, 143 (1896).

Extraktes in kurzer Zeit verschwindet und erst bedeutende Mengen das längere Andauern der Erscheinungen durch mehrere Minuten bewirken können, beweist, daß die Substanz, welche diese Erscheinungen hervorruft, schnell neutralisiert oder im Organismus zerlegt oder aus demselben teilweise ausgeschieden wird."

Eingehendere Untersuchungen über diesen Gegenstand rühren von Langlois*) und Athanasiu**) her. Es ergab sich, daß die blutdrucksteigernde Substanz durch ozonisierte Luft und durch die Oxydase des Krebsblutes leicht zerstört wird, und daß man die Blutgefäßwirkung der Nebennierenextrakte bei Kaltblütern durch Erwärmen der Tiere abkürzen, bei Warmblütern durch Abkühlen verlängern kann, was Langlois aus der Abhängigkeit der Oxydationsvorgänge von der Temperatur erklärte. Organbreiversuche (wobei frischer Leberbrei u. dgl. in Nebennierenextrakte eingebracht wurde), vergleichende Injektionen des Extraktes in eine Jugular- und eine Mesenterialvene, physiologische Prüfung des nach einer Injektion aus der Leber abströmenden Blutes und endlich Versuche der Ausschaltung der Leber aus dem Kreislaufe führten die genannten Autoren zu der Vorstellung, das schnelle Abklingen des Gefäßkrampfes wäre auf eine rasche oxydative Zerstörung der wirksamen Substanz zu beziehen, bei der die Leber vorwiegend beteiligt sei.

Da die wirksame Substanz der Nebenniere gegenwärtig nach dem Verfahren von Takamine und Aldrich in reinem kristallisiertem Zustande unschwer dargestellt werden kann, und da ferner der Blutdruckversuch eine annähernde Schätzung selbst minimaler Suprareninmengen mit ausreichender Genauigkeit gestattet, schien uns die Möglichkeit gegeben zu sein, der Frage nach der Zerstörung des Suprarenins durch die Leber und andere Organe auf dem Wege von Organbrei- bzw. von Durchblutungsversuchen näher zu treten.

Wir gingen bei unseren Versuchen folgendermaßen vor: Eine abgemessene Menge frischen Blutes wurde mit einer Lösung von kristallisiertem Suprarenin versetzt und der Durchblutungs- (bzw. Lüftungs-) versuch damit ausgeführt. Zu Beginn und in verschiedenen Stadien des Versuches wurden Proben des suprarenin-

*) P. Langlois, L'action des agents oxydants sur l'extrait des capsules surrénales. Du foie comme organe destructeur de la substance active des capsules surrénales. Compt. rend. soc. biol. **49**, 524 und 571. Vergl. auch Arch. de physiol. **30**, 124.

) Athanasiu et Langlois, Du rôle du foie dans la destruction de la substance active des capsules surrénales. Compt. rend. soc. biol. **49, 575 (1897).

haltigen Blutes entnommen und in einer Kältemischung im gefrorenen Zustande aufbewahrt. Noch am selben Tage wurden dann die einzelnen Blutproben nach entsprechender Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung durch den Kymographionversuch in bezug auf ihren Suprareningehalt verglichen; die intravenös injizierte Flüssigkeitsmenge betrug immer 1 ccm.

A. Verhalten des Suprarenins im Blute.

1. Versuch:

200 ccm defibrinierten und kolierten Rinderblutes wurden mit 0,1 g salzsauren Suprarenins (neutrale Lösung, 0,8 Proz. Kochsalz enthaltend) versetzt. Das Blut wurde unter Durchleitung eines lebhaften Luftstromes zwei Stunden bei 38 bis 40° gehalten. Probe I wurde sofort nach Zusatz des Suprarenins, II nach $^1/_2$ Stunde, III nach $1^1/_2$ Stunden, IV nach 2 Stunden entnommen. Der Kymographionversuch (Kaninchen) ergab bei jedesmaliger Injektion von 1 ccm:

Verdünnung	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{50}$	$^1/_{100}$	$^1/_{200}$	$^1/_{300}$	$^1/_{700}$	
Probe I	66	—	36	28	24	16	14	mm Blutdrucksteigerung.
„ II	58	36	24	—	—	—	—	
„ III	30	22	16	—	—	—	—	
„ IV	18	16	12	—	—	—		

Nach 2 St. Luftdurchleitung bei 38 bis 40° war also die Hauptmenge des Suprarenins zerstört worden.

2. Versuch:

Der Versuch 1 wurde mit der Abweichung wiederholt, daß das Rinderblut vor Zusatz der Suprareninlösung durch Gefrieren und Wiederauftauen lackfarben gemacht worden war, um die Wirkung lebender Blutzellen auszuschalten.

Außerdem wurde ein Parallelversuch zur Ermittelung des Einflusses der Blutalkaleszenz ausgeführt, indem das Blut durch eine Natriumkarbonatlösung von 0,2 Proz. ersetzt wurde. Kymographionversuch (Kaninchen):

α) Blut:

Verdünnung	$^1/_1$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{100}$	$^1/_{200}$	$^1/_{300}$	
Probe I	—	88	—	—	—	—	mm Blutdrucksteigerung
„ II	—	98	—	40	30	20	
„ III, IV			ganz unwirksam				

β) Sodalösung:

Probe I	—	—	24	16	—	—	mm Blutdrucksteigerung.
„ II, III, IV			ganz unwirksam.				

Demnach ging also auch im lackfarbenen Blute die Zerstörung des Suprarenins recht schnell vonstatten, derart, daß nach $1^1/_2$stündiger Luftdurchleitung bei Brutofentemperatur bereits jede Spur davon verschwunden war.

Bemerkenswerterweise vermochte aber eine Sodalösung, deren Konzentration ungefähr der Blutalkaleszenz entsprach, diese

Zerstörung unter den gleichen Bedingungen noch schneller und kräftiger zu bewerkstelligen als das Blut. Hier konnte bereits nach einer halben Stunde weder durch den physiologischen Versuch, noch durch die Eisenreaktion auch nur eine Spur von Suprarenin mehr nachgewiesen werden.

Das lackfarbene Blut erschien nach Verschwinden des Suprarenins tiefbraun gefärbt.

3. Versuch:

Vergleich von Pferde- und Rinderblut. Je 100 ccm Blut, mit 0,25 g salzsauren Suprarenins (neutrale Lösung) versetzt; $1^3/_4$ Stunden bei 40° Luft durchgeleitet. Probe I und II, vor bzw. nach beendeter Luftdurchleitung entnommen. Kymographionversuch (Kaninchen):

α) Pferdeblut:

Verdünnung	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	
Probe I	—	62	40	23	18	12	mm Blutdruck-
„ II	28	20	—	—	—	—	steigerung

β) Rinderblut:

Probe I	60	48	36	22	14	mm Blutdruck-
„ II	34	30	20	18	?	steigerung

Das Pferdeblut hatte also eine stärkere zerstörende Wirkung auf das Suprarenin ausgeübt als das Rinderblut.

4. Versuch:

Vergleich der Wirkung von Blut, Blutserum und Alkali. Je 10 ccm einer Suprareninlösung (salzsaures Salz) wurden zu je 200 ccm von Rinderblut, Pferdeserum, sowie einer Sodalösung von 0,1 Proz. (welche überdies 0,8 Proz. NaCl enthielt) hinzugefügt und die Proben I sogleich, die Proben II und III nach halb- bzw. zweistündiger Luftdurchleitung bei 40° entnommen. Kymographionversuch (Hund, 4 kg schwer):

α) Blut:

Verdünnung	1/1	1/10	1/25	1/50	
Probe I	114	28	—	0	mm Blutdruck-
„ II	160	24	0	—	steigerung
„ III	132	schwache Wirkung	0	—	

β) Serum:

Probe I	—	70	0	0	mm Blutdruck-
„ II	148	25	0	—	steigerung
„ III	ganz unwirksam				

γ) Sodalösung:

Probe I	108	schwache Wirkung	—	—	mm Blutdruck-
„ II	schwache Wirkung	0	—	—	steigerung.
„ III	ganz unwirksam				

Der Versuch lehrt, daß die Wirkung des Pferdeserums größer ist als diejenige des Rinderblutes, daß aber beide hinsichtlich des Vermögens, Suprarenin zu zerstören, von einer Sodalösung von 0,1 Proz. übertroffen werden.

Man wird daher schwerlich mit der Vermutung fehlgehen, daß die Suprarenin zerstörende Wirkung des Blutes, soweit eine solche überhaupt in Erscheinung tritt, in erster Linie durch seinen Alkaligehalt bedingt sein dürfte, und wird die relativ geringere Wirksamkeit des Blutes wohl am einfachsten in der Art deuten können, daß ein Teil des Blutalkalis in gebundener Form vorhanden ist.

B. Verhalten des Suprarenins gegenüber Organen.

5. Versuch:

Wirkung von Organbrei. Je 20 g der einem durch Chloroform getöteten Hunde in frischem Zustande entnommenen, feingehackten Organe (Leber, Lunge, Muskel) wurden in 100 ccm einer physiologischen Kochsalzlösung aufgeschwemmt und die Suspensionen nach Zusatz von je 10 ccm einer neutralen 2 proz. Suprareninlösung unter Durchleitung eines Luftstromes bei Bruttemperatur gehalten.

Der am Kymographion ausgeführte Vergleich der sogleich, bzw. nach ½ und 2 Stunden entnommenen Proben ergab, daß weder Leber-, noch Lungen-, noch Muskelbrei unter den angegebenen Bedingungen eine merkliche Suprareninmenge zu zerstören vermochten.

Zu dem gleichen Ergebnisse war der eine von uns schon früher gelangt, indem er frischen Leberbrei mit einer abgewogenen Menge Suprarenineisen versetzt, dieses nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur möglichst vollständig extrahiert und auf kolorimetrischem Wege bestimmt hatte.

6. Versuch:

Zusammenwirken von Blut- und Organbrei. Ein Hund wurde durch Verblutenlassen getötet, das Blut aufgefangen und defibriniert, die Leber zerkleinert. Je 0,25 g Suprarenin in gelöstem Zustande wurden hinzugefügt zu α) 150 ccm Blut, β) 100 ccm Blut + 50 g Leberbrei, γ) 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 50 g Leberbrei. Probe I wurde sogleich entnommen, II nach zweistündiger Luftdurchleitung bei 40°. Kymographionversuch (Kaninchen):

α) Blut:							
Verdünnung	1/50	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1000
Probe I	—	—	20, 32	16, 20	—	14, 16, 16	16
„ II	—	—	22, 24	—	20, 14	—	22, 18
β) Blut und Leber:							
Probe I	—	—	32	—	25	—	22
„ II	24	14, 18	12, 16, 14	keine deutl. Wirkung			
γ) NaCl phys. u. Leber:							
Probe I	—	—	34	—	22	—	20
„ II	—	—	34, 40	—	23	—	16

(Werte: mm Blutdrucksteigerung)

Im Blute, sowie in der Leber-Kochsalzprobe war daher keine Spur einer Supraremnzerstörung zu bemerken. Dagegen schien

eine solche in dem Blut-Lebergemenge stattgefunden zu haben. Der ganze Versuch wurde daher in genau derselben Weise wiederholt. Diesmal war aber auch in dem Blut-Lebergemenge von einer Abnahme des Suprarenins nichts zu merken.

7. Versuch:

Leberdurchblutung. Ein mittelgroßer Hund wurde durch Verbluten getötet und seine Leber mit 2 Liter frischen Rinderblutes unter Zusatz von 2,0 g Suprarenin durchblutet. Bezüglich der Technik sei auf die Angaben von Embden und Gläßner (diese Beiträge 1, 313 bis 315) verwiesen. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug ziemlich konstant 1 Liter in zehn Minuten, der Druck etwa 100 mm Hg, die Temperatur 38° bis 40°; die Dauer der Durchblutung zwei Stunden; die Kontrollprobe des Blutes wurde unter Luftdurchleitung bei 40° gehalten. Kymographionversuch (Kaninchen):

Verdünnung	$^1/_1$	$^1/_5$	$^1/_{25}$	
Blut vor der Durchblutung	50	24	16	mm Blutdrucksteigerung.
Blut nach der Durchblutung	40,40	20	—	
Blut nach Luftdurchleitung	70	18	20	

Ein zweifelloser SupDrareninschwund war also nicht festzustellen.

8. Versuch:

Leber-Durchblutung. Durchblutung einer Hundeleber mit Rinderblut wie oben. Der Suprareninzusatz betrug 0,5 g auf zwei Liter. Probe I wurde zu Beginn des Versuches II nach $^1/_2$ Stunde, III nach 1 Stunde, IV nach $1^1/_2$ Stunden entnommen. Kymographionversuch (Kaninchen):

Verdünnung	$^1/_{10}$	$^1/_{25}$	$^1/_{50}$	$^1/_{100}$	$^1/_{200}$	
Probe I	64	28	34	28	20	mm Blutdrucksteigerung.
„ II	70	48	32	28	22	
„ III	70	42	34	32	20	
„ IV	72	40	34	20	15	

Es hatte also hier sicherlich keine Suprareninzerstörung in größerem Ausmaße stattgefunden.

9. Versuch:

Lungendurchblutung. Hund durch Verblutenlassen getötet. Durchblutung mit 2370 ccm Rinderblut unter Zusatz von 0,5 g Suprarenin. Das Blut strömte durch den Conus arteriosus ein und durch eine in das linke Herzohr eingebundene Kanüle aus. Temperatur des einströmenden Blutes 40°, des ausströmenden Blutes 35° — Blutdruck 80 bis 100 mm Hg. Während des ganzen Versuches wurde von einer Trachealkanüle aus künstliche Atmung unterhalten, derart, daß die Arterialisierung des Blutes in natürlicher Weise erfolgte. Nach etwa halbstündiger Durchblutung begann eine Transsudation einer serösen kaum blutig gefärbten Flüssigkeit in die Bronchien und die Pleurahöhle. Nach $1^1/_4$ Stunden mußte der Versuch abgebrochen werden, da mehr als die Hälfte der Blutflüssigkeit infolge der massenhaften Transsudation aus der Zirkulation verschwunden war. Probe I wurde sogleich, II nach 55 Minuten, III nach $1^1/_4$ Stunden entnommen. Probe IV war das nach

3/4 Stunden aus der Trachea entnommene wässerige Transsudat. Kymographionversuch (Kaninchen):

Verdünnung	1/2	1/10	1/20	1/50	1/100	1/200	
Blut I	64	50	40	34	22	14	mm Blutdrucksteigerung.
„ II	—	—	—	20	—	12	
„ III	52	32, 32	30	14, 14	10, 12	nicht deutlich	
Transsudat IV	—	78	—	—	24	14	

Es war hier also eine Abnahme des Suprareningehaltes des Durchblutungsblutes deutlich bemerkbar; doch ist dieselbe keineswegs so groß, daß sie nicht einfach durch die Wirkung des Blutes als solchen erklärt werden könnte. Erwähnenswert scheint uns jedoch die sich aus der Untersuchung des Transsudates ergebende Tatsache, daß das Suprarenin die Gefäßwand unzersetzt passieren kann.

Zwei Durchblutungsversuche an Muskeln scheiterten an dem Umstande, daß, sobald das suprareninhaltige Blut in die Gefäße eindrang, der einsetzende Gefäßkrampf ein völliges Stocken des Blutstromes zur Folge hatte. Da bekanntlich sehr große Curaregaben eine Lähmung der nervösen Endapparate in den Gefäßen bewirken und da die Frage, ob das Suprarenin auf die Nervenendigungen oder aber auf die Muskelsubstanz als solche einwirkt, noch keineswegs erledigt ist, brachten wir einem großen Hunde im Laufe von zwei Stunden 2 g eines Curarepräparates subkutan bei, von dem bereits 0,1 bis 0,2 g die willkürlichen Muskeln völlig gelähmt hatten. Trotzdem der Blutdruck auf die Hälfte seines Anfangswertes abgesunken war, bewirkte intravenöse Suprarenininjektion noch immer eine ebenso mächtige Blutdrucksteigerung wie vor der Curarisierung, und machte der Gefäßkrampf auch hier eine Durchblutung unmöglich.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß bei zweistündiger Digestion von Suprarenin mit normalem Blute, lackfarbenem Blute oder Blutserum eine ganz beträchtliche Zerstörung von Suprarenin stattfinden kann. Auffälligerweise findet bei Zusatz von Muskel-, Leber- oder Lungenbrei zum Blute, sowie bei Durchblutungsversuchen ein geringerer oder auch gar kein Suprareninschwund statt. Da vergleichende Versuche mit schwachen Alkalilösungen lehrten, daß die Zerstörung des Suprarenins im Blute im wesentlichen eine Alkaliwirkung ist, liegt es nahe, das Ausbleiben dieser Zerstörung in den vorbezeichneten Fällen mit der Säurebildung in den Organen in Zusammenhang zu bringen.

Daß das schnelle Abklingen der Suprareninwirkung nicht etwa durch eine schnelle Ausscheidung oder Zerstörung durch die Nieren bewirkt sein kann, geht aus den eingangs erwähnten Versuchen Cybulskis hervor. Auch haben wir uns wiederholt davon überzeugt, daß der kurze Zeit nach intravenöser Beibringung größerer Suprareningaben aus der Blase entnommene Harn keine blutdrucksteigernde Substanz enthält.

Die Beibringung größerer Suprareningaben per os zum Zwecke des Studiums der Ausscheidungsverhältnisse erwies sich bei Hunden wegen des sogleich eintretenden Erbrechens als undurchführbar. Kaninchen sahen wir wiederholt nach Gaben von 0,1 bis 0,5 g schnell oder nach einiger Zeit zugrunde gehen. Doch gelang es, von einigen Tieren, denen der Mastdarm unterbunden worden war, um einer Verunreinigung des Urins durch Darminhalt vorzubeugen, etwas Harn zu gewinnen.

Der von einem Kaninchen, das 0,2 g Suprarenin mit Hilfe der Schlundsonde erhalten hatte, innerhalb zwölf Stunden gesammelte Urin zeigte insofern ein auffallendes Verhalten, als er auf Zusatz verdünnter Eisenchloridlösung eine ausgesprochen grüne, bei weiterem Zusatz von Natriumkarbonat eine deutlich rote Färbung annahm und sehr stark reduzierte.

Der Harn wurde mit Salzsäure schwach angesäuert, im Vakuum im Kohlensäurestrom bei 40 bis 50° eingeengt, mit dem mehrfachen Volumen von Methylalkohol gefällt, das Filtrat im Vakuum eingedunstet und der Rückstand in 5 ccm Wasser gelöst. Je 1 ccm dieser Lösung, welche eine schöne Eisenreaktion gab, steigerte bei intravenöser Applikation den Blutdruck eines Kaninchens um 40 bzw. 34 und 38 mm unter bedeutender Vergrößerung des Pulsvolumens.

Ein anderes Kaninchen, welches nach Unterbindung des Rektums 0,5 g Suprarenin per os erhalten hatte, schied einen Harn aus, der, alkalisch gemacht, mit Eisenchlorid eine dunkelkarminrote Färbung annahm. Bei Zusatz von Säure trat aber keine ausgesprochen grüne, sondern ein bräunliche Färbung auf. Der mit Salpetersäure neutralisierte Harn wurde mit neutralem Bleiazetat gefällt und der abfiltrierte und ausgewaschene Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das ganze Chromogen fand sich im Niederschlag; im Filtrate, welches das durch neutrales Bleiazetat nicht fällbare Suprarenin, falls solches vorhanden gewesen wäre, hätte enthalten müssen, fand sich nichts davon. Daß das Chromogen weder mit Brenzkatechin noch mit Protokatechusäure identisch war, ergab sich aus seiner Unlöslichkeit in Äther. Die physiologische Prüfung desselben wurde durch einen Unfall vereitelt.

Mag aber das Suprarenin als solches oder ein Derivat desselben in den Harn übergehen, stets handelt es sich, wie der kolorimetrische Vergleich nach Eisenchloridzusatz lehrt, nur um einen minimalen Bruchteil der in den Verdauungstrakt eingeführten Suprareninmenge. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß der Organismus doch über Mittel verfügt, um schließlich eine Zerstörung des Suprarenins herbeizuführen.

Die Frage jedoch, von der wir ausgingen, ob das schnelle Abklingen der Gefäßwirkung des Suprarenins auf eine rapide Oxydation desselben zu beziehen sei, glauben wir auf Grund der mitgeteilten Versuche verneinend beantworten zu dürfen. Wir halten es für wahrscheinlich, daß diese Erscheinung derart zu erklären sei, daß der Krampf der Gefäßmuskulatur aufhört, sobald die Konzentration des Suprarenins im Muskelgewebe durch Diffusion oder Verdünnung mit Blut und Gewebslymphe unter einen gewissen Schwellenwert abgesunken ist*).

Es liegt auf der Hand, daß eine solche Verdünnung sich besonders schnell vollziehen wird, wenn man das Suprarenin durch die Pfortader direkt in die großen Gefäßräume der Leber injiziert. So kann leicht der Schein entstehen, als ob dieses Organ eine augenblicklich erfolgende Zerstörung der wirksamen Substanz bewerkstelligen würde, während es sich vermutlich in Wirklichkeit nur um eine augenblicklich eintretende Verdünnung handelt.

Daß die Leber aber bei der allmählichen Zerstörung des Suprarenins im Organismus mitbeteiligt sein kann, soll natürlich nicht bestritten werden.

---

*) Prof. R. Gottlieb war so freundlich, uns darauf aufmerksam zu machen, daß nach Boehm (Archiv f. experim. Path. 4, 235) Barytsalze bei intravenöser Applikation eine ähnliche und ebenso schnell abklingende Blutdrucksteigerung hervorrufen, wie das Suprarenin.

XXXII.

Über das Verhalten des Fettes bei der Keimung ölhaltiger Samen.

Von Dr. **Otto von Fürth,**

Privatdozent und Assistent am physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Die in den Kotyledonen und im Endosperm der Pflanzensamen enthaltenen Reservestoffe, welche ihrer Hauptmenge nach aus Eiweißkörpern, Kohlehydraten oder Fetten bestehen, liefern bekanntlich das Material für das Wachstum der Keimpflanze. Die Untersuchungen von Hellriegel*), Sachs**), Peters***), Fleury†), Detmer††), Frankfurt†††) u. a. haben gelehrt, daß bei der Keimung ölreicher Samen eine Umwandlung von Fett in Kohlehydrat in größtem Ausmaße stattfindet, indem das aus den Reservestoffbehältern verschwindende Fett im wesentlichen das Material bildet, aus dem sich die Zellwände der jungen Pflanze aufbauen.

Die im folgenden mitgeteilte Untersuchung wurde auf Anregung Herrn Professor Hofmeisters und in der Hoffnung in Angriff genommen, aus dem Studium der Fettspaltung keimender Pflanzen vielleicht Anhaltspunkte für den Chemismus der Umwandlung des Fettes im Tierkörper gewinnen zu können. Trotz-

---

*) Hellriegel, Beitrag zur Keimungsgeschichte der ölgebenden Samen. Journ. f. prakt. Chemie **64**, 94 (1855).

) Sachs, Über das Auftreten von Stärke bei der Keimung ölhaltiger Samen. Botan. Zeitung **17, 177 (1859).

***) Peters, Zur Keimungsgeschichte des Kürbissamens. Landwirtsch. Versuchsstationen **3**, 1 bis 18 (1861).

†) Fleury, Recherches chimiques sur la germination. Ann. de Chimie (4) **4**, 38 (1865).

††) Detmer, Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Keimung ölhaltiger Samen. Dissert. Jena 1875.

†††) Frankfurt, Über die Zusammensetzung der etiolierten Keimpflanzen von Cannabis sativa und Helianthus annua. (Aus dem agrikulturchemischen Institut in Zürich.) Landwirtsch. Versuchsstat. **43**, 143 (1894).

dem diese Erwartung nicht in Erfüllung gegangen ist, möge es mir immerhin gestattet sein, die Versuchsergebnisse in Kürze mitzuteilen.

Wie aus den Untersuchungen von Pelouze*), Siegmund**), Green***) und Connstein†) hervorgeht, enthalten ölhaltige Samen ein kräftig wirksames Ferment, das befähigt ist, Fett zu Fettsäuren und Glyzerin aufzuspalten. Green war der Meinung, daß bei der Keimung von Rizinussamen eine so schnelle Fettspaltung erfolge, daß bereits nach wenigen Tagen alles Fett der Verseifung anheimgefallen sei. Jedoch auch die dadurch in Freiheit gesetzten hohen Fettsäuren sollen bereits nach Ablauf von etwa acht Tagen bis auf Spuren aus den Keimlingen verschwinden, um einer sowohl in Wasser, als auch in Äther löslichen, leicht diffundierenden und gut kristallisierenden Säure unbekannter Art Platz zu machen.

Aus vergleichenden Analysen des Fettes gekeimter und ungekeimter Samen zog Müntz††) den Schluß, daß die Fettsäuren während der Entwickelung der jungen Pflanze immer mehr und mehr Sauerstoff in sich aufnehmen. Es lag daher nahe, eine allmähliche Umwandlung hoher Fettsäuren in Oxysäuren zu vermuten.

Maquenne†††) glaubte aus Beobachtungen an keimenden Arachis- und Rizinussamen folgern zu können, daß nur ungesättigte, nicht aber gesättigte Fettsäuren zu einer Umformung in Kohlehydrat befähigt sind, und zwar meinte er, daß die in ersteren enthaltenen Alkylkomplexe auf dem Wege intermediärer Glyzerinbildung das Material zum Aufbau des Zuckers liefern.

Ein besonderes Interesse für die Frage der Zuckerbildung aus Fett schienen Versuche von Mazé*†) zu bieten. Dieser zerrieb

*) Pelouze, Mémoire sur la saponification des huiles etc. Ann. de Chimie (3) **45**, 319 (1855).

) Siegmund, Über fettspaltende Fermente im Pflanzenreich. Monatsh. f. Chemie **11, 272 (1890).

***) Green, On the Germination of the Seed of the Castor oil Plant. Proc Roy. Soc. London **47**, 147 und **48**, 370 (1890).

†) Connstein, Hoyer u. Wartenberg, Über fermentative Fettspaltung. Berichte d. deutschen chem. Gesellsch. **35**, 3908 (1902).

††) Müntz, Sur la germination des graines oléagineuses. Ann. de Chimie (4) **22**, 472 (1871).

†††) Maquenne, Sur les changements de composition qu'éprouvent les graines oléagineuses au cours de la germination. Compt. rend. **127**, 625 (1898).

*†) Mazé, Recherches sur la digestion des réserves dans les graines etc. **130**, 424 (1900).

gekeimte Rizinussamen mit Sand, hielt den Brei in dünner Schicht bei einer Temperatur von 35° und beobachtete in demselben eine Neubildung von reduzierendem Zucker, welche er durch eine fermentative Umwandlung von Fett in Kohlehydrat erklärte.

In bezug auf Verbindungen, welche etwa als Zwischenprodukte zwischen Fett und Kohlehydrat gedeutet werden könnten, vermochte ich in der Literatur keine Angaben zu finden; — es wäre denn, daß man Frankfurts Befund von Glyoxyl- und Äpfelsäure in Hanf- bzw. Sonnenblumenkeimlingen hierher rechnen will.

Meine eigenen Untersuchungen bezogen sich auf Sonnenblumen- und Rizinuskeimlinge. Dieselben wurden in feuchtem Sande gezogen, und zwar die ersteren bei Zimmer-, die letzteren bei Brutofentemperatur.

A. Helianthus.

Zur Analyse des Fettes dienten Keimpflanzen von Helianthus, die sich nach vier Wochen bei Zimmertemperatur sehr gleichmäßig zu einer Wurzellänge von 4 bis 5 cm entwickelt hatten. Die Keimlinge wurden gesiebt, gewaschen, ausgelesen, von den locker aufsitzenden Samenhüllen befreit, fein zerhackt, dreimal mit Wasser ausgekocht, abgepreßt, bei 90° getrocknet, fein gepulvert und endlich mit Äther extrahiert. Aus 640 gr trockener Keimlinge wurden so noch 48 g eines braunen Öles (entsprechend 7,5 Proz.) gewonnen. Es war also selbst nach vierwöchentlicher Dauer der Keimung ein nicht unbeträchtlicher Bruchteil des Fettes der Zerstörung entgangen.

Zum Vergleiche wurde in analoger Weise Fett aus ungekeimten Sonnenblumensamen dargestellt.

Die Fettanalyse erfolgte unter genauer Befolgung der von Benedikt und Ulzer gegebenen Vorschriften.

a) Fett aus Keimlingen von Helianthus annuus.

1. 4,809 g Fett verbraucht, in Äther-Alkohol gelöst, zur Neutralisation (Phenolphthalein) 6.1 ccm $^n/_2$-Lauge = 0,1708 g KOH — Säurezahl = 35,5.

2. 4,630 g Fett verbraucht zur Verseifung 33,6 ccm $^n/_2$-NaOH = 0,9408 g KOH — Verseifungszahl = 203,0.

3. 0,6573 g Fett verbraucht bei der Bestimmung nach Hübl 0,5907 g Jod — Jodzahl = 89,9. 0,5720 g Fett verbraucht bei der Bestimmung nach Hübl 0,5259 g Jod — Jodzahl = 91,9.

4. Der Rest des Öles wurde durch Kochen mit alkoholischer Lauge verseift, die Seifenlösung nach Vertreibung des Alkohols mit Schwefelsäure zersetzt, das abgeschiedene, aus freien Fettsäuren bestehende Öl nach viermaligem Auskochen mit Wasser bei 90° getrocknet, sodann durch dreistündiges Kochen mit einem Überschusse von Essigsäure-

anhydrid acetyliert, das Gemenge acetylierter Fettsäuren viermal mit Wasser ausgekocht und getrocknet. 4,107 g der acetylierten Fettsäuren neutralisierten 24,2 ccm n/2-Lauge = 0,6796 g KOH. Acetylsäurezahl = 164,9. Dieselbe Menge, nach vorausgegangener Verseifung mit alkoholischer Lauge neutralisierte 31,6 ccm n/2-Lauge = 0,8848 g KOH. Acetylverseifungszahl = 215,4.

β) Fett aus ungekeimten Helianthussamen.

1. 4,804 g Fett verbraucht, in Äther-Alkohol gelöst, 0,6 ccm n/2-Lauge = 0,0168 g KOH, Säurezahl = 3,5.

2. 4,677 g Fett verbraucht zur Verseifung 31,9 ccm n/2-Lauge = 0,8932 g KOH — Verseifungszahl = 190,9.

3. 0,5330 g Fett verbraucht bei der Bestimmung nach Hübl 0,6139 g Jod — Jodzahl = 115,2. 0,5788 g Fett verbraucht bei der Bestimmung nach Hübl 0,6200 g Jod — Jodzahl = 107,1.

4. 4,758 g acetylierten Fettes neutralisiert direkt 20,5 ccm n/2-Lauge = 0,5740 g KOH — Acetylsäurezahl = 120,8. Dieselbe Menge acetylierten Fettes nach vorausgegangener Verseifung neutralisiert 35,4 ccm n/2-Lauge = 0,9912 g KOH — Acetylverseifungszahl = 208,3.

B. Rizinus.

Rizinuskeimlinge, die sich bei Bruttemperatur innerhalb neun Tagen zu einer Wurzellänge von 4 cm entwickelt hatten, wurden erst am Wasserbade, dann in dünner Schicht bei 90° getrocknet, fein gepulvert, mit Äther extrahiert, der Rückstand der ätherischen Lösung wiederholt mit Wasser ausgekocht und bei 108° getrocknet. Aus 185 g der trockenen Keimlinge wurden so 24,67 g eines braunen Öles (entsprechend 11,7 Proz. der Trockensubstanz) erhalten.

Fett aus Keimlingen von Ricinus communis.

1. 4,469 g Fett verbraucht, in Alkohol-Äther gelöst, zur Neutralisation 6,7 ccm n/2-KOH = 0,1876 g KOH. Säurezahl 41,9.

2. 2,259 g Fett verbraucht zur Verseifung 15,3 ccm n/2-KOH = 0,4284 g KOH — Verseifungszahl 189,6.

3. 0,4530 g Fett verbraucht bei der Bestimmung nach Hübl 0,4048 g Jod — Jodzahl 89,4.
0,5625 g Fett „ „ „ „ „ „ 0,4892 g Jod — Jodzahl 86,9.

4. Der Rest des Öles wurde zum Zwecke der Abtrennung der darin im freien Zustande vorhandenen Fettsäuren in alkohol-ätherischer Lösung mit Natronlauge neutralisiert, die Lösung eingedampft und der Rückstand durch wiederholtes Auskochen mit Äther und Benzol nach Möglichkeit von Fett befreit. Doch gelang so die Trennung von Seife und Neutralfett nur in unvollkommenem Maße, da die Seifengallert noch viel Fett einschloß. Die fetthaltigen Seifen wurden nun in Wasser gelöst, mit Salzsäure zerlegt, das Öl mit heißem Wasser ausgekocht, solange dieses noch eine Spur Säure aufnahm, sodann getrocknet.

0,9675 g der so abgetrennten Fraktion neutralisierten direkt in äther-alkoholischer Lösung 2,7 ccm n/2-Lauge (= 0,0756 g KOH), nach

Verseifung jedoch 7,0 ccm n/2-Lauge (= 0,0196 g KOH). Daraus berechnet sich für diese Fraktion

Säurezahl	78,2	Mittleres Molekulargewicht der Fettsäuren
Ätherzahl	123,8 d	$M = \frac{168300 - 38\ d}{3\ k} = 269$
Verseifungszahl	202,0 k	

	Helianthus		Rizinus	
	Öl aus Keimlingen	Öl aus ungekeimt. Samen	Öl aus Keimlingen	Öl aus ungekeimt. Samen
Säurezahl	35,5	3,5	41,9	
Ätherzahl d	167,5	187,4	147,7	
Verseifungszahl k	203,0	190,9	189,6	176—186*)
Jodzahl	89,9, 91,9	107,1, 115,2	86,8, 89,4	88,8
Acetylsäurezahl	164,9	120,8		
Acetylzahl	50,5	87,5		
Acetylverseifungszahl	215,4	208,3		
Mittleres Molekulargewicht d. Fettsäuren, berechnet $M = \frac{168300-38d}{3\ k}$	265	281	286	290—305*)

Überblicken wir die mitgeteilten Resultate, so ersehen wir folgendes: Aus dem Umstande, daß noch in einem späten Stadium der Keimung erhebliche Mengen unzersetzten Neutralfettes vorhanden sind, sowie aus den im Verhältnis zu den Verseifungszahlen niederen Säurezahlen ergibt sich, daß die eingangs erwähnten Vorstellungen Greens**) keineswegs zutreffen, und daß von einer totalen Spaltung des Keimlingsfettes in Fettsäuren und Glyzerin, sowie von einer reichlichen Anhäufung der ersteren in der jungen Pflanze keine Rede sein kann. Offenbar erfolgt in dem Maße, als die Fettspaltung sich vollzieht, sehr schnell ein weiterer Abbau der Fettsäuren.

Auch finden sich keine Anhaltspunkte für die Vorstellung, daß sich bei der Keimung eine ausgiebige Umwandlung normaler Fettsäuren in Oxyfettsäuren vollziehe. Eine solche müßte in einem erheblichen Ansteigen der Acetylzahl zum Ausdrucke kommen; tatsächlich wurde bei Helianthus ein geringes Absinken derselben beobachtet.

*) Benedikt-Ulzer.

**) loc. cit.

Ebensowenig hat man Grund, anzunehmen, daß ungesättigte Fettsäuren während der Keimung wesentlich leichter angegriffen werden als gesättigte. Wäre dies der Fall, so müßten die Jodzahlen während der Keimung stark abnehmen. Eine solche Abnahme wurde aber bei Helianthus nur in geringem Maße wahrgenommen, bei Rizinus jedoch ganz vermißt.

Schließlich sah ich mich auch in der Erwartung getäuscht, einen schrittweisen Abbau der Fettsäuren zu kürzeren Kohlenstoffketten in einer wesentlichen Abnahme des mittleren Molekulargewichtes der Fettsäuren in Erscheinung treten zu sehen. Eine solche Abnahme ließ sich zwar feststellen, doch fiel dieselbe kaum außerhalb der Fehlerquellen.

Auch der Versuch, einen solchen Abbau auf dem Wege der Autolyse zu erzielen, schlug fehl.

Dreiwöchentliche Helianthuskeimlinge wurden zerkleinert und der Brei in zwei Hälften geteilt: die eine Hälfte wurde eine Woche lang unter Toluolzusatz und Durchleitung eines Luftstromes im Brutofen belassen, die andere dagegen sogleich weiter verarbeitet. Beide Portionen wurden bei 60° getrocknet, mit Äther extrahiert und das Fett bei 108° getrocknet.

1. 2,500 g Fett, nicht autolysiert, neutralisiert 3,8 ccm n/2-Lauge (= 0,1064 g KOH) — Säurezahl 42,6.

2. 2,310 g Fett, nicht autolysiert, neutralisiert nach Verseifung 16,3 ccm n/2-Lauge (= 0,4564 g KOH) — Verseifungszahl 197,6.

3. 3,834 g Fett, autolysiert, neutralisiert 3,7 ccm n/2-Lauge (= 0,1030 g KOH) — Säurezahl 26,9.

4. 1,995 g Fett, autolysiert, neutralisiert nach Verseifung 13,9 ccm n/2-Lauge (= 0,3892 g KOH) — Verseifungszahl 190,1.

Sonach:

	nicht autolysierte Hälfte	autolysierte Hälfte
Säurezahl	42,6	26,9
Ätherzahl d	155,0	163,9
Verseifungszahl k	197,6	190,8
Mittleres Molekulargewicht der Fettsäuren	274	284

$$M = \frac{168300 - 38\ d}{3\ k}$$

Ich habe weiterhin eine Reihe von Versuchen ausgeführt, um mich von der Richtigkeit der Angabe Greens, betreffend das reichliche Auftreten einer in Wasser und Äther löslichen, nicht kristallisierenden Säure an Stelle des verschwindenden Fettes, zu überzeugen. Ich vermochte jedoch diese Angabe in keiner Weise zu bestätigen. Die Acidität des Wasserextraktes der Keimlinge ist überhaupt keine sehr erhebliche, und von dieser entfällt nur ein geringer Bruchteil auf ätherlösliche Säuren. [So betrug z. B. die Acidität des Wasserextraktes aus 100 g feuchter 14tägiger Rizinus-

keimlinge 62,1 ccm $^{n}/_{10}$-Lauge (Phenolphthalein), wovon aber nur 7,4 Proz. auf ätherlösliche Säuren entfielen.] Auch in gebundenem Zustande ist keine ätherlösliche Säure in größeren Mengen vorhanden [Bestimmung durch Extraktion des mit Phosphorsäure angesäuerten Wasserauszuges mit Äther im Schacherlapparate].

Eine größere Menge von Helianthuskeimlingen wurde mit Wasser ausgekocht, der Auszug durch essigsaures Cinchonin von reichlich vorhandenen Gerbsäuren, sodann durch Ammoniak von Cinchonin befreit und nach Neutralisation mit Salpetersäure mit Bleiessig gefällt. Nach Zerlegung des Niederschlages mit Schwefelwasserstoff erwiesen sich die erhaltenen sauren Verbindungen nur sehr unvollkommen und zum geringsten Teile in Äther löslich. Die Flüssigkeit enthielt große Mengen eines kolloiden, gallertig ausfallenden Kohlehydrates; nach dessen Beseitigung durch Kupferacetat wurde eine Lösung gewonnen, die eine Säure von folgendem Verhalten enthielt: Dieselbe reduziert Fehlingsche Flüssigkeit und ammoniakalische Silberlösung sehr kräftig, wird von Quecksilberacetat, nicht aber von Quecksilberchlorid, Kupfer-, Baryum- und Kalziumsalzen gefällt. Bleiacetat erzeugt einen voluminösen, in Essigsäure unlöslichen, in verdünnter Salpetersäure leicht löslichen Niederschlag. Wird die saure Lösung mit Eisenchlorid versetzt und tropfenweise Natriumkarbonat hinzugefügt, so tritt eine schöne smaragdgrüne Färbung auf, die bei Mehrzusatz von Alkali in Rotbraun umschlägt, Natriumkarbonat allein bewirkt eine bräunliche Färbung. Beim Erwärmen mit verdünnter Salpetersäure nimmt die Lösung eine Gelbfärbung an, welche beim Übersättigen mit Alkali in ein intensives Rotgelb übergeht.

Das Verhalten dieser Substanz deutet auf eine aromatische, mehrfach hydroxylierte Verbindung hin. Der Versuch, dieselbe durch Quecksilberacetatfällung abzutrennen, scheiterte an der Zersetzlichkeit derselben.

Bei Destillation von frischen Rizinus- oder Helianthuskeimlingen im strömenden Wasserdampfe konnte weder eine flüchtige Säure, noch aber Alkohol, Aceton oder ein Aldehyd nachgewiesen werden. Sollten also derartige Verbindungen als Zwischenprodukte zwischen Fett und Kohlehydrat eine Rolle spielen, so ist jedenfalls die in einem gegebenen Momente vorhandene Menge derselben so gering, daß sie sich dem Nachweise entzieht. Auch im gebundenen Zustande sind flüchtige Säuren nicht in nachweisbarer Menge vorhanden.

Die Nachprüfung der Angaben Mazés*) in bezug auf das

*) loc. cit.

Auftreten eines Enzymes, das direkt Fett in Zucker umwandeln soll, ergab, daß der genannte Autor durch Nichtbeachtung eines in den Keimlingen vorhandenen diastatischen Fermentes anscheinend einer Täuschung anheimgefallen ist. Ich unterwarf Rizinuskeimlinge in zerkleinertem Zustande einer dreitägigen Autolyse in Toluolwasser unter Luftdurchleitung bei 30 bis 35° und vermochte tatsächlich, Mazés Angaben entsprechend, auf titrimetrischem Wege eine erhebliche Zunahme des reduzierenden Zuckers nachzuweisen. (Feuchte Keimlinge frisch: 1,41 Proz. Zucker, autolysiert 4,07 Proz. Zucker, als Dextrose berechnet.) Da es mir aber wahrscheinlich schien, daß ein diastatisches Ferment vorhanden sei, welches nicht reduzierende in reduzierende Kohlehydrate umwandelt, unterwarf ich Proben der Keimlinge einer hydrolytischen Spaltung durch dreistündiges Kochen mit verdünnter Schwefelsäure. Nunmehr ergab der titrimetrische Vergleich der Keimlinge vor und nach der Autolyse keine außerhalb der Fehlergrenzen gelegene Differenz des gesamten Zuckergehaltes (Keimlinge frisch, mit Säure behandelt, 4,00 Proz., autolysiert 4,76 Proz. Zucker).

Schließlich möchte ich bemerken, daß mir bei Anlage und Behandlung der Keimlingskulturen die freundlichen Ratschläge der Herren Professor Jost und Privatdozent Dr. Hannig zustatten gekommen sind.

XXXIII.

Zur Physiologie des Warmblütermuskels.

Von Dr. **Walther Freund**,

Assistenten der Klinik.

(Aus dem Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik zu Breslau.)

Im Hinblick auf die Beobachtungen und Experimente von Jaques Loeb*) über den osmotischen Druck des Froschmuskels veranlaßte mich vor einiger Zeit mein Chef, Herr Professor Czerny, zu einer Reihe von experimentellen Untersuchungen, die in letzter Linie darauf abzielten, die Veränderungen im osmotischen Verhalten der Gewebe bei den schweren Ernährungsstörungen des Säuglingsalters unserem theoretischen Verständnis näher zu bringen. Loeb hatte gezeigt, daß der unverletzt herauspräparierte Gastrocnemius des Frosches mit einer 0,7 proz. Kochsalzlösung isotonisch ist, d. h. unter bestimmten Versuchsbedingungen sein Volumen in derselben nicht ändert, daß aber sein osmotischer Druck gegenüber minimalen Mengen von Säuren und Basen, sowie gegenüber Konzentrationsänderungen der umgebenden Lösung sich als äußerst empfindlich erweist. Es lag nun nahe, behufs Studiums der Veränderungen des Salzstoffwechsels im kranken Organismus nachzusehen, ob irgendwelche experimentellen Schädigungen, von denen eine Alteration des Wasser- und Salzbestandes, der Reaktion der Gewebe usw. erwartet werden konnte, zu Änderungen des osmotischen Druckes eines unmittelbar post mortem herauspräparierten Muskels führen würden. Um die Versuche den Verhältnissen beim Menschen anzunähern, kam es darauf an, einen Warmblütermuskel zu finden, der sich leicht unverletzt gewinnen ließ und sich somit zu analogen Versuchen, wie die von Loeb am Froschgastrocnemius angestellten, eignete.

---

*) Pflügers Archiv **69** u. **71**, Physiologische Untersuchungen über Ionenwirkungen.

Ein solcher Muskel fand sich in dem musculus palmaris*) des Kaninchens, der in zwei Endsehnen ausläuft und daher sehr leicht zu präparieren ist. Zunächst mußte durch Vorversuche festgestellt werden, wie sich dieser Muskel in osmotischer Beziehung gegenüber Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration verhält; alsdann folgten Versuche über den Einfluß experimenteller Schädigungen auf das osmotische Verhalten des unmittelbar post mortem bzw. nach der Tötung herauspräparierten Muskels. An dieser Stelle will ich nur über die Ergebnisse der physiologischen Vorversuche kurz berichten, die vielleicht darum einiges Interesse verdienen, weil Zahlen über den osmotischen Druck des Warmblütermuskels meines Wissens bisher noch nicht vorliegen.

In der Versuchsanordnung folgte ich den Angaben von Loeb und beobachtete alle Kautelen, die er für seine Untersuchungen am Froschmuskel angegeben hat. (Möglichst gleiche Größe der Muskeln, vor dem Tode Muskelruhe der Versuchstiere, schnelle Entnahme der unverletzten Muskeln etc.) Es kamen zur Verwendung Kochsalzlösungen von 0,5, 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,5 Proz. Der frische, gewogene Muskel wurde immer genau eine Stunde in der betr. Lösung belassen, dann über Fließpapier gerollt und von neuem gewogen, die Gewichtsveränderung in Prozenten des Anfangsgewichtes ausgedrückt. Die so an 55 normalen Muskeln erhaltenen Werte sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Zu bemerken ist noch, daß das absolute Gewicht der untersuchten Muskeln etwa 0,2 bis 0,3 g betrug.

Diese Übersicht zeigt im allgemeinen bei den gleich behandelten Muskeln eine desto größere Übereinstimmung in ihrem Verhalten gegenüber der umgebenden Lösung, d. h. in ihrer Gewichtsveränderung, je kleiner diese letztere ist.

In der 1,5 proz. Kochsalzlösung verändert die Mehrzahl der Muskeln übereinstimmend ihr Gewicht gar nicht, der Rest zeigt minimale Abnahme. Wir dürfen also den osmotischen Druck der verwendeten Muskeln durchschnittlich etwa dem einer Kochsalzlösung gleichsetzen, deren Konzentration nur wenig geringer ist als 1,5 Proz. Lösungen von wesentlich geringerer Konzentration wird durchgehends vom Muskel Wasser entzogen, wiewohl individuelle Schwankungen, deren Vorhandensein auch Loeb trotz möglichster Gleichheit der Versuchsbedingungen nicht ganz auszuschalten vermochte, derart vorkommen, daß für einzelne Muskeln sich eine 1,3- bzw. 1,1 proz. Kochsalzlösung als isotonisch herausgestellt hat. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß dann, wenn rechter und linker Muskel desselben Tieres in der gleichen Lösung verweilten, sich stets eine vollkommen übereinstimmende Gewichtsänderung nachweisen ließ.

*) Nach Krause, Anatomie des Kaninchens. 2. Auflage. Leipzig 1884.

Proz.-geh. d. Koch-salz-lösung	Gewichtsveränderung der Muskeln bei einstündigem Verweilen in der betr. Lösung (angegeben in Prozenten des Anfanggewichtes).	
0,5	+ 45,7 + 34,1 + 26,2	im Mittel aus 3 Versuchen + **35,3**
0,7	+ 28,0 + 23,0 + 22,7 + 22,5 + 21,6 + 20,6 + 18,7	im Mittel aus 7 Versuchen + **22,4**
0,9	+ 16,1 + 15,8 + 11,9 + 10,8 + 10,7 + 10,1 + 9,7 + 9,5 + 9,4 + 8,9 + 7,0	im Mittel aus 11 Versuchen + **10,9**
1,1	+ 9,0 + 5.4 + 5,0 + 5,0 + 4,2 + 2,8 + 2,5 + 2,1 ± 0 ± 0	im Mittel aus 10 Versuchen + **3,6**
1,3	+ 4,9 + 4,3 + 2,8 + 2,6 ± 0 ± 0 ± 0	im Mittel aus 7 Versuchen + **2,1**
1,5	± 0 ± 0 ± 0 ± 0 ± 0 ± 0 ± 0 ± 0 ± 0 ± 0 ± 0 − 1,4 − 2,2 − 2,5 − 2,9 − 2,9 − 3,2	Im Mittel aus 17 Versuchen − **1,1**

Die Tabelle zeigt weiter, daß die Gewichtszunahmen mit der zunehmenden osmotischen Druckdifferenz zwischen Muskel und Lösung nicht proportional wachsen, sondern weit schneller. Dieses auch den Froschmuskeln eigene Verhalten findet, wie durch Loeb nachgewiesen, seine Erklärung darin, daß die Hypotonie der Lösung eine Giftwirkung auf das Gewebe äußert, die mit Erhöhung des osmotischen Druckes einhergeht und somit den Muskel befähigt, einer Lösung mehr Wasser zu entziehen, als er in intaktem Zustande, entsprechend der osmotischen Druckdifferenz, getan hätte. Die Schädigung der Muskeln findet vermutlich auch darin ihren Ausdruck, daß mit der zunehmenden Entfernung von der isotonischen Konzentration die Übereinstimmung in den erhaltenen Werten eine immer geringere wird, der angegebenen Durchschnittszunahme dementsprechend eine immer bedingtere Gültigkeit zukommt.

XXXIV.

Über ein proteolytisches Ferment im Blute bei myelogener Leukämie.

Von **O. Schumm.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Eppendorf.)

Die Kenntnis von dem Vorhandensein einer nicht koagulierbaren albumoseartigen Substanz im leukämischen Leichenblute verdanken wir E. Ludwig[1]). Er hielt die von ihm aufgefundene Substanz den damaligen Anschauungen entsprechend für Pepton. Von verschiedenen Seiten[2]) wurde dieser Befund bestätigt. Bei Fällen von „lienal-myelogener" Leukämie fand man im Leichenblute stets eine nicht koagulierbare, albumoseartige Substanz. Nur in einem Falle ist auch im „lebenden" leukämischen Blute eine solche Substanz gefunden worden (v. Jaksch)[3]).

In den bisher untersuchten Fällen von Lymphämie[4]) wurde keine Albumose gefunden, auch nicht nach 48stündigem Stehen bei 30° (Erben).

Meines Wissens ist noch keine Untersuchung darüber angestellt worden, wie die im leukämischen Leichenblute vorhandene albumoseartige Substanz entsteht. Nachdem im Jahre 1894 Matthes[5]) bei einer sorgfältigen Untersuchung leukämischen Blutes festgestellt hatte, daß die erwähnte Substanz in ihrem Verhalten große Ähnlichkeit mit einer der durch Verdauung entstehenden Albumosen besaß und sie demnach geradezu als eine sogenannte Deuteroalbumose ansprach, war es naheliegend, anzunehmen, daß die Substanz im leukämischen Blute einem „Verdauungsprozesse", also einer fermentativen Wirkung ihre Entstehung verdanke. In einer im Jahre 1900 in der Zeitschrift für Klinische Medizin erschienenen Abhandlung „Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung lymphämischen Blutes" äußert sich Erben folgendermaßen: „Die Befunde in der Literatur bezüglich des Pepton- bzw.

Albumosengehaltes des leukämischen Blutes weisen darauf hin, daß in den polynucleären Leukocyten entweder ein Körper, der postmortal leicht peptonartige Substanzen abspaltet, oder aber wahrscheinlicher ein Ferment enthalten ist, das natürlich nach dem Tode des Gewebes bei günstigen Bedingungen seine Wirkung entfaltet, die dann in der Gegenwart von peptonartigen Körpern sich äußert. Daß dieses Ferment im lebenden Organismus nicht zur Wirkung kommt, (was noch mehr als aus dem Fehlen des Peptons im lebenden Blute aus dem Mangel von Albumosurie bei Leukämie erhellt) ist leicht aus der großen Bindekraft des Blutes gegenüber Fermenten erklärlich.

Auffallend ist nun nicht sowohl der Mangel des Peptons im lebenden Blute unserer Fälle, als besonders die Tatsache, daß im aseptisch aufgefangenen Blute auch nach längerem Stehen unkoagulierbare Eiweißkörper nicht nachzuweisen waren. Sollte sich dieser Befund bestätigen (meiner gründet sich nur auf die vorliegenden zwei Fälle), so wäre wohl ein fundamentaler Unterschied zwischen den polynucleären Leukocyten und den Lymphocyten auch in chemischer Beziehung damit gegeben, daß nur die polynucleären Leukocyten Fermentträger wären, die Lymphocyten dagegen fermentfrei sind."

Ist die Annahme, daß die albumoseartige Substanz im leukämischen Blute durch fermentative Eiweißspaltung entsteht, richtig, so darf man es als wahrscheinlich betrachten, daß sich in solchem Blute nicht nur eine einzige Art von Albumosen auffinden läßt, sondern mehrere. Ferner erscheint es auf Grund unserer heutigen Kenntnisse von der Wirkung verschiedener eiweißspaltender Fermente des Tierkörpers nicht aussichtslos, in solchem Blute auch nach tiefer stehenden fermentativen Spaltungsprodukten der Eiweißkörper zu suchen. Das Auffinden mehrerer von den Substanzen, die als typische Produkte fermentativer Eiweißspaltung gelten, würde es schon sehr wahrscheinlich machen, daß ein proteolytisches Ferment seine Wirkung ausgeübt hat. Dann aber wäre zu hoffen, daß sich unter geeigneten Bedingungen an solchem Blute ein Fortdauern der Wirkung des proteolytischen Fermentes würde zeigen lassen.

Bei zwei Fällen von myelogener Leukämie habe ich eine derartige Untersuchung ausgeführt. Bei dem ersten Falle habe ich mich darauf beschränkt, die albumoseartige Substanz zu untersuchen. Es ergab sich, daß sie aus einem Gemisch verschiedener Albumosen bestand. Ich habe mich damit begnügt, drei Fraktionen darin nachzuweisen, vermute aber, daß diese sich noch weiter

würden aufteilen lassen. Bei dem zweiten Falle konnte ich nachweisen, daß im Blute neben verschiedenen Albumosen Leucin und Tyrosin vorhanden waren. Ferner ließ sich im Blute die Anwesenheit eines proteolytischen Ferments feststellen, unter dessen Einfluß während einer 21tägigen Digestion eine bedeutende Vermehrung nicht koagulierbarer, stickstoffhaltiger Substanzen eintrat.

Erster Fall.*) 25jähriger Mann, Schiffskoch. Am 11. VII. 02 fiel ein Sack auf ihn**), er taumelte und stieß mit der linken Wade gegen einen eisernen Pfahl. Am 18. VII. 02 wurde er ins Krankenhaus aufgenommen. Diagnose: Hämatom der linken Wade. Am 27. VII. stellten sich in der rechten Seite des Leibes Schmerzen ein. Am 28. abends plötzlich Temperatursteigerung; das Abdomen ist leicht aufgetrieben und gespannt. Am 30. VII. auch in der linken Seite Schmerzen; hier findet sich eine umschriebene druckempfindliche Resistenz. Da es sich nach dem vorliegenden Befund um das Vorhandensein eines perityphlitischen Abszesses zu handeln scheint, wird die Eröffnung desselben beschlossen. Am 2. VIII. Operation. Der vermeintliche Abszeß erweist sich als ein Teil der kolossal vergrößerten Milz. Am 4. VIII. tritt unter zunehmender Herzschwäche der Tod ein. — Bei einer am 2. VIII. vorgenommenen Urinuntersuchung konnte ich weder Eiweiß noch Nucleoalbumin noch Albumose nachweisen. — Bei der Sektion, die 20 Stunden nach dem Tode ausgeführt wurde, zeigte sich, daß die Bauchhöhle ganz von geronnenen Blutmassen gefüllt war.

1600 g der Blutmassen wurden mit 1100 g Wasser und einer reichlichen Menge Chloroform***) vermischt, mit Essigsäure schwach angesäuert, mit Ammoniumsulfat in der Kälte gesättigt und der Niederschlag auf einem Filter gesammelt†). Die Hauptmenge des Niederschlags wurde mit viel Alkohol verrieben und so zwei Monate lang aufbewahrt. Der Niederschlag wurde dann abfiltriert, nach dem Abdunsten des Alkohols mit $1^1/_2$ Liter Wasser verrieben und im Pergamentschlauch zwei Tage gegen fließendes Wasser dialysiert, die Flüssigkeit auf 35° erwärmt und filtriert. Das Filtrat wurde von neuem mit Ammoniumsulfat in der Kälte gesättigt, der Niederschlag mit 200 ccm Wasser verrieben und im Pergamentschlauch 32 Stunden gegen destilliertes Wasser unter mehrfachem Wechseln des letztern dialysiert.

a) Untersuchung der Innenflüssigkeit.

Sie wurde bei essigsaurer Reaktion vorsichtig enteiweißt, das Filtrat mit Ammoniumsulfat in der Kälte gesättigt, der in sehr reichlicher Menge entstandene Niederschlag abfiltriert, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung

*) Von diesem Falle stammte auch die Milz, über deren Untersuchung ich kürzlich berichtet habe. (Diese Beiträge **3**, 12, 576.)

**) Aus Rücksicht auf den erforderlichen Raum ist hier nur ein kurzer Auszug aus der Krankengeschichte gegeben.

***) Im Verlaufe dieser ganzen Untersuchung wurde in allen Fällen das Material durch reichliche Anwendung von Chloroform vor der Zersetzung durch Bakterien bewahrt (nach Salkowski), auch wo dies nicht ausdrücklich angegeben ist.

†) Bei allen Filtrationen wurde hartes Filtrierpapier (Nr. 602) von Schleicher und Schüll verwandt.

ausgewaschen. Er ließ sich leicht durch Wasser von gewöhnlicher Temperatur in Lösung bringen. Diese wurde zwei Tage lang gegen destilliertes Wasser unter mehrmaligem Wechseln des letzteren dialysiert. Im letzten Außenwasser ließen sich nur noch Spuren von Ammoniumsulfat nachweisen.

α) Aus der Innenflüssigkeit konnte ich in reichlicher Menge ein Gemisch von Albumosen abscheiden, das unter Anwendung von Ammoniumsulfat in drei Fraktionen zerlegt wurde. Am bedeutendsten an Menge war die durch Ganzsättigung, etwas geringer die durch $^2/_3$-Sättigung und noch geringer die durch Halbsättigung fällbare Albumose. Das Gemisch dieser Albumosen war durch Lauge nicht denaturierbar, gab intensive Biuretreaktion, starke Millonsche Reaktion und eine starke Reaktion auf leicht abspaltbaren Schwefel. Die Reaktionen auf Histon und Mucin fielen negativ aus; durch Kochen mit verdünnter Salzsäure ließ sich keine reduzierende Substanz abspalten. Neben diesen Albumosen enthielt die Innenflüssigkeit noch in geringerer Menge eine schwer koagulable Eiweißsubstanz, von der Spuren bei Halbsättigung, der größte Teil bei $^2/_3$-Sättigung und ein kleiner Teil bei Ganzsättigung mit Ammoniumsulfat ausfiel. Von dieser Substanz ließen sich die Albumosen aus der gemeinschaftlichen Lösung dadurch trennen, daß letztere zur Trockne eingedampft und mit wenig heißem Wasser aufgenommen wurde. Diese Lösung war bis auf Spuren frei von dem koagulablen Eiweißstoff.

β) Beim Eindampfen der vereinigten Portionen des Außenwassers bis zur Bildung einer Salzhaut schieden sich klebrige Klümpchen aus. Sie wurden rasch mit Wasser abgespült und dadurch ziemlich rein erhalten. Sie lösten sich vollständig in Wasser auf und waren durchaus frei von koagulabler Eiweißsubstanz. [Letzteres beweist gleichzeitig, daß die Substanz tatsächlich dialysierbar ist; hätte es sich um einen Durchtritt der Innenflüssigkeit durch Fehlstellen des Pergamentschlauches gehandelt, so hätte sich im Außenwasser auch koagulable Eiweißsubstanz nachweisen lassen müssen.] Die Lösung gab intensive Biuretreaktion.

b) Untersuchung des Außenwassers.

Sowohl die während der ersten 24 Stunden wie auch die in den folgenden acht Stunden der Dialyse erzielte Außenflüssigkeit war albumosehaltig. Beim Eindampfen auf ein kleines Volumen schied die Außenflüssigkeit der ersten 24 Stunden harzige Massen ab, die sich klar in Wasser lösten. Eine Probe dieser Lösung gab intensive, fast rote Biuretreaktion. Die Hauptmenge wurde mit Ammoniumsulfat in der Kälte gesättigt, die ausgeschiedene harzige Masse rasch einige Male mit kaltem Wasser abgespült, dann in kaltem Wasser gelöst. Die gelbe, schwach sauer reagierende Lösung war frei von koagulablem Eiweiß; sie gab starke Biuretreaktion. Durch Essigsäure wurde sie nicht getrübt, auch nicht durch Salpetersäure. Durch Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung und etwas Essigsäure oder Salpetersäure entstanden starke Trübungen, die sich beim Erhitzen leicht vollständig lösten, beim Erkalten wiederkehrten. Bei vorsichtigem Zusatz von verdünntem Ammoniak blieb die Flüssigkeit vollkommen klar. Der Rest wurde mit verdünntem Ammoniak neutralisiert und auf sein Verhalten gegen Ammoniumsulfat geprüft; bei Halbsättigung und bei Ganzsättigung entstanden nur schwache Fällungen, bei $^2/_3$-Sättigung dagegen starke Fällung. Die während der weiteren acht Stunden bei der Dialyse erzielte Außenflüssig-

keit lieferte nach dem Einengen beim Sättigen mit Ammoniumsulfat eine kleinere Menge von Albumosen in Gestalt harziger gelblicher Klümpchen.

Die angeführten Beobachtungen beweisen das Vorhandensein mehrerer albumoseartiger Substanzen; am reichlichsten sind die sogenannten sekundären Albumosen vertreten, die man früher als Deuteroalbumosen bezeichnete.[6])

Zweiter Fall. Auffallend schwere Form von myelogener Leukämie. 22jähriges Mädchen, schon während der Schuljahre schwächlich; im Verlaufe von Jahren sich herausbildende starke Milzschwellung; keine Schwellung der Lymphdrüsen. — Sie starb einige Tage nach ihrer Aufnahme in das Krankenhaus. Der Tod erfolgte durch eine im Anschluß an das Platzen einer haselnußgroßen Ovarialcyste eintretende Blutung in die Bauchhöhle. Vier Stunden nach dem Tode wurde von den einige Liter betragenden geronnenen Blutmassen aus der Bauchhöhle ein halbes Liter, vorwiegend Flüssiges, unter sorgfältiger Vermeidung jeglicher Verunreinigung herausgenommen. 470 ccm des Blutes wurden sofort mit dem gleichen Volumen Wasser im Mörser zerrieben, in einer Flasche unter reichlichem Zusatz von Chloroform stark durchgeschüttelt und in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde in einer mit Glasstöpsel verschlossenen Flasche in den Brutofen (bei 37°) gestellt. Die andere Hälfte wurde in einer gut verschlossenen Flasche bis zum nächsten Morgen im Eisschrank aufbewahrt, 100 ccm zur Ammoniakbestimmung herausgenommen, der Rest nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure aufgekocht, nach dem Erkalten reichlich mit Chloroform versetzt, auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und in gut verschlossener Flasche in den Brutofen gestellt. Verschiedentlich wurde während der Digestionszeit die Sterilität der beiden Flüssigkeiten festgestellt. Nach drei Wochen wurden beide aus dem Brutofen genommen; sie enthielten noch reichlich Chloroform und waren steril. Ich bezeichne im folgenden die vor der Digestion nicht aufgekochte Portion mit „A", die vor der Digestion aufgekochte mit „B". Bei A war die über dem Bodensatze stehende Flüssigkeit tief bräunlich-gelb mit einem Stich ins Grün, bei B schwach gelblich. Von A und B wurden nach kräftigem Umschütteln 100 ccm zur Ammoniakbestimmung herausgenommen, die Reste durch Aufkochen bei schwach essigsaurer Reaktion und Filtrieren enteiweißt, die Eiweißkoagula mit heißem Wasser sorgfältig ausgewaschen und die enteiweißten Flüssigkeiten soweit verdünnt, daß 4 ccm 1 g Blut entsprachen. Beide Flüssigkeiten wurden in gleicher Weise auf ihr Verhalten bei Zusatz von Bromwasser geprüft, bei der Biuretprobe, bei der Millonschen Reaktion und bei fraktionierter Fällung mit Ammoniumsulfat nach vorheriger Neutralisation mit verdünntem Ammoniak. Gleiche, größere Portionen beider Flüssigkeiten wurden auf Leucin und Tyrosin verarbeitet. Leucin wurde durch die Art der Sublimation und durch die Scherersche Probe identifiziert; Tyrosin wurde in den typischen, schönen garben- und büschelförmigen Kristallaggregaten erhalten und außerdem durch die Millonsche und Mörnersche Reaktion[7]) identifiziert. Endlich wurde in beiden Flüssigkeiten der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und der Ammoniakstickstoff nach Nencki und Zaleski[8]) und nach Schlösing bestimmt. Es wurde peinlich genau darauf geachtet, daß die Analysen der beiden Flüssigkeiten in genau gleicher Weise zur Ausführung gelangten.

Bei den Stickstoffbestimmungen wurde die zu zerstörende Flüssigkeit unter Zusatz eines Tröpfchens Quecksilber nicht weniger als zwei Stunden mit dem Säuregemisch erhitzt. Bei den Ammoniakbestimmungen verfuhr ich genau nach den Angaben von Nencki und Zaleski; nur benutzte ich ein unten geschlossenes Destilliergefäß und kochte vor der Titration das Destillat zur Entfernung der Kohlensäure aus[9]). Letzteres geschah auch bei den Stickstoffbestimmungen, um etwa vorhandene, die Titration fehlerhaft beeinflussende, flüchtige Substanzen zu entfernen. Die Ammoniakbestimmungen nach Schlösing führte ich in Apparaten mit weiten Glasschalen und niedrigen Glasglocken aus, bei deren Anwendung ich in Kontrollversuchen aus reinen Lösungen von geringem Gehalte an Chlorammonium richtige Ammoniakwerte erhielt. Die Proben blieben drei Tage stehen. Sowohl bei den Stickstoffbestimmungen, wie auch bei den Ammoniakbestimmungen wurde der Stickstoffgehalt der Reagentien und des Wassers durch Blindversuche ermittelt und die entsprechende geringe Menge in Abzug gebracht.

Die bei der Untersuchung erhaltenen Befunde sind der Übersichtlichkeit halber tabellarisch zusammengestellt.

Tabelle I.

Ammoniak, nach Nencki und Zaleski im nicht enteiweißten Blut bestimmt, in 100 ccm Blut:

Nach 19stündigem Stehen im Eisschrank bei Gegenwart von Chloroform	Nach sofortigem Aufkochen und darauf folgender 21-tägiger Digestion bei 37°, bei Gegenwart von Chloroform	Nach 21tägiger Digestion bei 37°, bei Gegenwart von Chloroform
0,0104 g	0,0157 g	0, 0464 g

Tabelle II.

Aus den Analysen der enteiweißten Filtrate von A und B berechnen sich folgende Werte für 100 g Blut:

		A	B
Gesamtstickstoff der nicht koagulierbaren Substanzen		1,298 g	0,416 g
Ammoniak	nach Nencki und Zaleski bestimmt	0,0479 g (= 0,0395 g N)	0,0151 g (= 0,0125 g N)
Ammoniak	nach Schlösing bestimmt	0,0617 g (= 0,0508 g N)	0,0194 g (= 0,0160 g N)

Im Einklange mit der bedeutenden Zunahme nicht koagulabler Stickstoffsubstanzen bei der Digestion der nicht gekochten Portion (A) stehen die folgenden Befunde, durch welche der Verlauf der fermentativen Eiweißspaltung weiter gekennzeichnet wird:

Tabelle III.

	Tryptophan-Reaktion	Millons Reaktion	Biuret-Reaktion	Primäre Albumosen	Sekundäre Albumosen	Pepton (Kühne)	Leucin und Tyrosin
Portion A enteiweißt	stark positiv	intensive Rotfärbung	stark positiv, rot	geringe Menge	ziemlich reichlich vorhanden	vorhanden	ziemlich reichlich vorhanden
Portion B enteiweißt	schwach positiv	mäßige Rotfärbung	stark positiv, violettrot	ziemlich reichlich vorhanden	ziemlich reichlich vorhanden	nicht nachweisbar	geringe Menge

Der beobachtete Vorgang bietet hiernach durchaus das Bild einer fermentativen Eiweißspaltung. Eine weitere Verarbeitung des übrigen Materials habe ich noch nicht ausgeführt, da sie wegen seiner immerhin kleinen Menge nur geringen Erfolg versprach. Ich beabsichtige, diesen Rest der Verdauungsprodukte zusammen mit neuem Material zu untersuchen. Vermutlich werden sich dann noch weitere Produkte der fermentativen Eiweißspaltung gewinnen lassen.

Die bei der nicht gekochten Portion (A) beobachtete Zunahme des Ammoniakstickstoffs während der Digestion ließ die Ausführung eines Vergleichsversuchs mit möglichst normalem menschlichen Blute wünschenswert erscheinen. In Ermangelung geeigneteren Materials untersuchte ich vorläufig das Blut in zwei Fällen, bei denen ich Änderungen der chemischen Eigenschaften des Blutes im Sinne der bei Leukämie vorhandenen für unwahrscheinlich hielt.

Im ersten Falle handelte es sich um Tabes dorsalis, Insufficientia valvulae mitralis et aorticae, Emphysem; ferner bestanden Stauungserscheinungen. Am 23. VI. 03 entnahm Herr Dr. Franke 175 ccm Blut durch Venäsektion. Ich schüttelte sofort 168 g des Blutes mit 160 g Wasser und 8 g Äther und stellte die Flüssigkeit in einer verschlossenen Flasche in den Eisschrank. Am nächsten Morgen wurden etwa 200 g abgegossen, 52 g sofort zur Ammoniakbestimmung nach Nencki und Zaleski verwandt; 70 g nach Zusatz von Chloroform in den Brutofen gestellt; weitere 70 g nach dem Verdünnen mit etwas Wasser und Ansäuern mit Essigsäure*) aufgekocht, eine Minute im Sieden erhalten, quantitativ in eine Flasche übergefüllt, nach dem Erkalten mit Chloroform

*) Den Zusatz von Essigsäure habe ich in diesem Falle gemacht, um sicher jeden Ammoniakverlust beim Aufkochen zu vermeiden.

versetzt und ebenfalls in den Brutofen gestellt. Nach sechs Wochen wurde in beiden Portionen der Ammoniakgehalt bestimmt. —

Im zweiten Falle handelte es sich um einen alten Mann, der einen Gehirnschlag erlitten hatte. Am 1. VII. 03 entnahm Herr Dr. Müller durch Venäsektion einige hundert ccm Blut*), die in einem etwas Toluol enthaltenden Glasgefäß aufgefangen wurden. 148 g des Blutes mischte ich sofort mit dem gleichen Volumen Wasser. Von dieser Flüssigkeit wurden 74 g nach Zusatz von Chloroform und Toluol in den Eisschrank gestellt und am nächsten Morgen auf Ammoniak untersucht; 148 g wurden nach Zusatz von Chloroform und Toluol gleich in den Brutofen gestellt; 74 g wurden ferner nach dem Verdünnen mit etwas Wasser aufgekocht (absichtlich ohne Essigsäurezusatz), quantitativ in eine Flasche übergeführt, nach dem Erkalten mit Chloroform und Toluol versetzt und ebenfalls in den Brutofen gestellt. Nach drei Wochen wurde in beiden Portionen das Ammoniak bestimmt.

Die bei diesen Fällen ermittelten Werte sind mit den bei der Untersuchung des leukämischen Blutes erhaltenen in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle IV.
Ammoniak, nach Nencki und Zaleski im nicht enteiweißten Blute bestimmt; in 100 g Blut:

	Nach 19- bis 20-stündigem Stehen im Eisschrank bei Gegenwart von Chloroform	Nach sofortigem Aufkochen und darauf folgender Digestion bei Gegenwart von Chloroform, bei I. 6 Wochen lang, bei II. u. III. 3 Wochen lang	Nach Digestion bei Gegenwart von Chloroform, bei I. 6 Wochen lang, bei II. u. III. 3 Wochen lang
I. Tabes dorsalis, Insufficientia valvulae mitralis et aorticae, Emphysem, Stauungserscheinungen. Venäsektion.	0,0004 g	0,0045 g	0,0079 g
II. Gehirnschlag. Venäsektion	0,0012 g	0,0068 g	0,0085 g
III. Myelogene Leukämie. — Leichenblut.	0,0104 g	0,0157 g	0,0464 g

Beim leukämischen Blute wurde in der nicht aufgekochten Portion nach drei Wochen langer Digestion etwa dreimal soviel Ammoniak gefunden wie in der vor der Digestion aufgekochten Probe. Demnach hat eine ziemlich erhebliche fermentative Ammoniakbildung stattgefunden, als deren Ausdruck auch der verhältnismäßig hohe Anfangswert für Ammoniak in der vor der

*) Der Kranke starb noch am Abend desselben Tages.

künstlichen Digestion untersuchten Blutportion anzusehen ist. Er übertrifft die bei den beiden anderen Fällen (I u. II der Tabelle IV) gefundenen Anfangswerte um das Vielfache.

Die bei den Fällen I und II ermittelten Zahlen scheinen zwar darauf hinzudeuten, daß überhaupt im menschlichen Blut bei der Digestion in Gegenwart von Chloroform eine geringfügige fermentative Ammoniakbildung erfolgt. Indes ist zu berücksichtigen, daß es sich bei den Fällen I und II doch nur um minimale Mengen von Ammoniak handelt und daher die durch die Analyse ermittelten Zahlen nur als annähernd richtige zu betrachten sind. Ob wirklich eine fermentative Ammoniakbildung bei der Digestion normalen, gegen Bakterieneinwirkung geschützten menschlichen Blutes stattfindet, muß noch durch eine besondere Versuchsreihe festgestellt werden. —

Durch die vorliegende Untersuchung ist das Vorkommen eines proteolytischen Fermentes im Blute bei myelogener Leukämie sichergestellt. Dadurch erklärt sich auch in einfacher Weise der Gehalt solchen Blutes an Albumosen. —

Über die Wirkungsweise dieses Ferments beabsichtige ich weitere Versuche anzustellen und im Anschluß daran auch eine Untersuchung des Knochenmarks auszuführen. —

Das in dieser Untersuchung benutzte Material wurde mir von den Herren Prosektor Dr. E. Fraenkel, Oberarzt Dr. Sick, Oberarzt Dr. Rumpel, Dr. K. Reuter (Prosektor am hiesigen Hafenkrankenhause, früher Assistenzarzt in Eppendorf), sowie den Herren Assistenzärzten Dr. Moltrecht, Dr. Müller und Dr. Franke in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt. Den genannten Herren spreche ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank aus.

Literaturverzeichnis.

1. E. Ludwig, Wiener med. Wochenschr. 1881.

2. v. Jaksch, Zeitschr. f. klin. Medizin **6**, 1883. — v. Jaksch, Zeitschr. f. phys. Chemie **16**, 1892. — v. Jaksch, Klin. Diagnostik, 4. Aufl. 1896. — Freund und Obermayer, Zeitschr. f. phys. Chemie **15**, 1891. — Matthes, Berl. klin. Wochenschr. 1894. — v. Limbeck, Grundriß einer klin. Pathologie des Blutes. Jena 1896.

3. v. Jaksch, loc. cit. — Devoto, Rivista clinica **30**, 1891 (zitiert nach v. Jaksch).

4. Straus, Charité-Annalen 1898 (zitiert nach Erben). — Erben, Zeitschr. f. klin. Medizin **40**, 1900.

5. loc. cit.

6. Pick, Zeitschr. f. phys. Chemie **24**, 1898.

7. Mörner, Zeitschr. f. phys. Chemie **37**.

8. Nencki und Zaleski, Zeitschr. f. phys. Chemie **33**.

9. Siegfried, Anmerkung in der Arbeit von O. Thiele, Zeitschr. f. phys. Chemie **37**, 297.

Analytische Belege*).

Zu Tabelle I. Ammoniakbestimmungen nach Nencki und Zaleski.

1. 100 ccm verdünntes Blut = 50 g Blut, nach Zusatz von Chloroform 19 Stunden im Eisschrank gestanden, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 3,05 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 = 0,005185 g NH_3 = 0,01037 Proz. NH_3.
2. 100 ccm verdünntes Blut = 50 g Blut, aufgekocht und danach 3 Wochen unter Zusatz von Chloroform bei 37° digeriert, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 4,62 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 = 0,007854 g NH_3 = 0,015708 Proz. NH_3.
3. 100 ccm verdünntes Blut = 50 g Blut, nach Zusatz von Chloroform 3 Wochen bei 37° digeriert, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 13,66 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 = 0,023222 g NH_3 = 0,046444 Proz. Ammoniak.

Zu Tabelle II. Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl und Ammoniakbestimmungen nach Nencki und Zaleski und nach Schlösing.

1. Je 10 cm des enteiweißten Filtrats von A = 2,5 g Blut erforderten bei der Stickstoffbestimmung 23,16 ccm resp. 23,21 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4, im Mittel 23,19 ccm = 0,032466 g N = 1,29864 Proz. N.
2. Je 10 ccm des enteiweißten Filtrats von B = 2,5 g Blut erforderten bei der Stickstoffbestimmung 7,47 resp. 7,37 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4, im Mittel 7,42 ccm = 0,010388 g N = 0,41552 Proz. N.
3. 40 ccm des enteiweißten Filtrats von A = 10 g Blut erforderten zur Bindung des nach Nencki und Zaleski ausgetriebenen Ammoniaks 2,82 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 = 0,004794 g NH_3 = 0,04794 Proz. NH_3 = 0,03948 Proz. Ammoniakstickstoff.
4. 40 ccm des enteiweißten Filtrats von B = 10 g Blut erforderten zur Bindung des nach Nencki und Zaleski ausgetriebenen Ammoniaks 0,89 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 = 0,001513 g NH_3 = 0,01513 Proz. NH_3 = 0,01246 Proz. Ammoniakstickstoff.
5. 40 ccm des enteiweißten Filtrats von A = 10 g Blut erforderten zur Bindung des nach Schlösing ausgetriebenen Ammoniaks 3,63 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 = 0,006171 g NH_3 = 0,06171 Proz. NH_3 = 0,05082 Proz. Ammoniakstickstoff.
6. 40 ccm des enteiweißten Filtrats von B = 10 g Blut erforderten zur Bindung des nach Schlösing ausgetriebenen Ammoniaks 1,14 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 = 0,001938 g NH_3 = 0,01938 Proz. NH_3 = 0,01596 Proz. Ammoniakstickstoff.

---

*) Durch Blind-Versuche war festgestellt, daß von der gebundenen Menge $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 bei den Ammoniakbestimmungen nach Nencki und Zaleski 0,15 ccm und bei den Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl 0,40 ccm als Korrektur in Abzug zu bringen waren.

Zu Tabelle IV. Ammoniakbestimmungen nach Nencki und Zaleski.

a) Tabes dorsalis.

1. 52 g verdünntes Blut = 26 g Blut, 19 Stunden im Eisschrank gestanden, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 0,06 ccm $\frac{N}{10}H_2SO_4$ = 0,000102 g NH_3 = 0,0004 Proz. NH_3.
2. 70 g verdünntes Blut = 35 g Blut, aufgekocht und danach 6 Wochen bei 37° digeriert, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 0,92 ccm $\frac{N}{10}H_2SO_4$ = 0,001564 g NH_3 = 0,00447 Proz. NH_3.
3. 70 g verdünntes Blut = 35 g Blut, 6 Wochen lang bei 37° digeriert, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 1,63 ccm $\frac{N}{10}H_2SO_4$ = 0,002771 g NH_3 = 0,00792 Proz. NH_3.

b) Haemorrhagia cerebri.

1. 74 g verdünntes Blut = 37 g Blut, 20 Stunden im Eisschrank gestanden, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 0,26 ccm $\frac{N}{10}H_2SO_4$ = 0,000442 g NH_3 = 0,00119 Proz. NH_3.
2. 74 g verdünntes Blut = 37 g Blut, aufgekocht und danach 3 Wochen bei 37° digeriert, erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks 1,49 ccm $\frac{N}{10}H_2SO_4$ = 0,002533 g NH_3 = 0,006846 Proz. NH_3.
3. Verdünntes Blut, 3 Wochen bei 37° digeriert; davon erforderten zur Bindung des ausgetriebenen Ammoniaks:
   α) 74 g = 37 g Blut 1,84 ccm $\frac{N}{10}H_2SO_4$ = 0,003128 g NH_3 = 0,008454 Proz. NH_3.
   β) 70 g = 35 g Blut 1,74 ccm $\frac{N}{10}H_2SO_4$ = 0,002958 g NH_3 = 0,008451 Proz. NH_3, Mittel 0,0084525 Proz. NH_3.

XXXV.

Über das Vorkommen von Albumosen im Blute.

Von **O. Schumm.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Eppendorf.)

Während nach Neumeister im normalen Blute Albumosen und Peptone nicht vorkommen sollen, kamen neuerdings Embden und Knoop[1]), ferner Langstein[2]) bei ihren Untersuchungen in Übereinstimmung mit älteren Autoren zum gegenteiligen Ergebnis. Embden und Knoop schließen aus ihren an Blut von Hunden angestellten Versuchen, „daß im normalen Blute Albumosen vorkommen können". Langstein untersuchte „drei Ochsenblutsera, sieben Pferdeblutsera und zweimal Blutserum von Menschen, das durch zu curativen Zwecken ausgeführte Aderlässe an Herzkranken mit schweren Stauungserscheinungen gewonnen war". Er fand in allen Fällen, aber in sehr verschiedener Menge eine nicht koagulable Substanz. Die Arbeiten von Embden und Knoop und von Langstein veranlassen mich, schon jetzt, vor Abschluß meiner Versuche, über einen Fall von chronischer Schrumpfniere zu berichten, bei dem es mir gelang, aus dem durch Venäsektion entnommenen Blute in verhältnismäßig reichlicher Menge eine albumosenartige Substanz abzuscheiden. Ich habe mich dabei im wesentlichen des seinerzeit von Matthes[3]) bei der Untersuchuug leukämischen Blutes benutzten Verfahrens bedient.

Da es zur Beurteilung derartiger Befunde indes notwendig ist, die angewandte Methodik genau zu kennen, gebe ich nachstehend eine ausführliche Beschreibung des von mir eingeschlagenen Weges.

Chronische Schrumpfniere.

Am 9. X. 01 wurden dem Patienten durch Venäsektion 360 g Blut entnommen, unter aseptischen Kautelen in einem sterilen Kolben aufgefangen und so bei etwa 15° im Zimmer stehen ge-

lassen. Nach 20 Stunden war noch keine Gerinnung eingetreten. Dann wurden 245,4 g Serum abgehoben und unter Zusatz von Chloroform (nach Salkowski) und Thymol mit zuvor pulverisiertem reinsten neutralen Ammoniumsulfat kalt gesättigt. Der aus dem Blutkörperchenbrei und etwas Serum bestehende Rest im Gewichte von 113 g (im folgenden kurz als „Blutkörperchenbrei" bezeichnet) wurde ebenso behandelt. Beide Gemische wurden filtriert, die beiden Niederschläge gesondert mit dem mehrfachen Volumen absoluten Alkohols verrieben und so in mit Glasstöpseln verschlossenen Gefäßen im Zimmer aufbewahrt. —

Die beiden Filtrate wurden sofort durch Eindampfen auf dem Wasserbade und Absaugen von dem ausgeschiedenen Ammoniumsulfat auf etwa 20 ccm eingeengt. Die dem Serum entstammende Flüssigkeit war gelblich, die dem Blutkörperchenbrei entstammende hellbräunlichgelb. In den mit einem Volumen Wasser verdünnten Flüssigkeiten entstand bei vorsichtigem Zusatz von Tanninlösung keine Ausscheidung. Echtes Pepton (Kühne) war somit nicht nachweisbar. Nachdem die durch Ammoniumsulfat aus dem Serum und dem Blutkörperchenbrei erhaltenen Niederschläge zu möglichster Koagulation der Eiweißkörper zwei Monate unter Alkohol gestanden hatten, wurde der Alkohol abfiltriert, zuletzt unter Benutzung der Saugpumpe. Die weitere Verarbeitung geschah folgendermaßen:

a) Der Niederschlag aus dem Serum wurde mit etwa 400 ccm Wasser unter Zusatz alkoholischer Thymollösung verrieben und in zwei Pergamentschläuchen zunächst 18 Stunden gegen stehendes, dann 48 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert, wobei für genügenden Thymolgehalt der Flüssigkeit gesorgt wurde. Der Inhalt der beiden Schläuche wurde gemischt, die völlig neutral reagierende Flüssigkeit halbiert und die eine Hälfte zurückgestellt.

Die andere Hälfte wurde bei neutraler Reaktion im Jenaer Stehkolben vorsichtig aufgekocht, sofort durch ein Filter aus hartem Papier filtriert, das Filtrat sogleich mit wenigen Tropfen Essigsäure angesäuert, nochmals aufgekocht und filtriert. Das Filtrat war klar, nur in dicker Schicht zeigte es eine minimale Opaleszenz. Nach dem Erkalten wurde es nochmals filtriert. Die Flüssigkeit zeigte folgendes Verhalten: Essigsäure-Ferrocyankalium bewirkte keine Spur einer Trübung. Sie gab schwache, aber deutliche Biuretreaktion. Mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols gab sie eine mäßig starke Trübung. Bei der Salpetersäure-Schichtprobe entstand kein weißer Ring, nach einigen Minuten aber an der Berührungsstelle Gelbfärbung. Beim Auf-

kochen und Zusatz von $^{1}/_{10}$ Volumen Salpetersäure blieb die Flüssigkeit völlig klar, es entstand aber Gelbfärbung. Nach Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung blieb die Flüssigkeit in der Kälte und beim Erhitzen klar. — Die Hauptmenge wurde nun allmählich mit pulverisiertem reinstem Ammoniumsulfalt gesättigt.

Schon bevor alles Salz gelöst war, entstand eine reichliche flockige Ausscheidung. Durch Abfiltrieren wurde eine nicht unbedeutende Menge eines etwas klebenden dunkelgrauen Niederschlags erhalten. Dieser wurde mit etwas Wasser angerieben, die Flüssigkeit durch Zusatz einer Spur Sodalösung genau neutralisiert, filtriert, aufgekocht, durch ein „hartes" Filter filtriert und das Filtrat mit der dreifachen Menge absoluten Alkohols gefällt. Der entstandene reichliche grobflockige weiße Niederschlag wurde zur Entfernung etwa noch anhaftender Spuren von Thymol an der Saugpumpe gründlich mit absolutem Alkohol ausgewaschen. Nach dem Abdunsten des Alkohols wurde der graue Rückstand mit etwas Wasser verrieben, wobei fast vollständige Lösung eintrat, die Flüssigkeit aufgekocht und filtriert. Das Filtrat war schwach gelblich gefärbt und besaß eine geringe Opaleszenz. Ein kleiner Teil wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand auf dem Platinblech erhitzt. Die Substanz verbrannte unter Entwicklung des Geruchs nach verbranntem Horn; gleichzeitig entwich Ammoniak, von beigemengtem Ammoniumsulfat herrührend. Die Flüssigkeit gab ferner deutliche Biuretreaktion (rotviolett) und starke Millonsche Reaktion (Flüssigkeit und Flocken tief rot). Beim Erhitzen wie auch beim darauf folgenden Erkalten trübte sie sich nicht. Beim Aufkochen unter Zusatz von $^{1}/_{10}$ Volumen Salpetersäure entstand keine Trübung, nur starke Gelbfärbung, beim nachherigen Übersättigen mit Ammoniak tiefgelbe Färbung. Auch in der Kälte wurde die Flüssigkeit durch Zusatz kleinster bis größerer Mengen von Salpetersäure nicht getrübt. Ebenso wenig entstand eine Trübung bei Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung und etwas Salpetersäure oder Essigsäure. Zusatz von sehr verdünnter wie von stärkerer Ammoniakflüssigkeit bewirkte keine Trübung. Ebenso bewirkte Zusatz von Essigsäure und Ferrocyankalium keine Trübung. Kochen der Flüssigkeit mit Kalilauge und einer Spur Bleiacetatlösung bewirkte Braunfärbung. Eine nähere Charakterisierung der Substanz war aus Mangel an Material nicht möglich. Das angegebene Verhalten führt dazu, sie als eine albumosenartige Substanz anzusprechen.

Es ist oben gesagt worden, daß die Hälfte der nach dem Dialysieren resultierenden Flüssigkeit einstweilen zurückgestellt wurde. Sie ist vor der weiteren Verarbeitung auf 37° erwärmt und einige Stunden im Brutschrank gehalten worden, um etwa vorhandene schwer lösliche „Albumosen" möglichst in Lösung zu bringen. Im übrigen wurde sie in gleicher Weise verarbeitet wie die andere Hälfte, und es wurde in etwa gleicher Menge eine Substanz gewonnen, die in ihrem Verhalten der oben beschriebenen glich.

b) Bei der Verarbeitung des Niederschlags aus dem „Blutkörperchenbrei" wurde genau das unter „a" angewandte Verfahren befolgt. Beim Sättigen der enteiweißten Flüssigkeit mit Ammoniumsulfat wurde nur eine ganz spärliche Ausscheidung erhalten. Der durch Abfiltrieren gewonnene Niederschlag war so gering, daß eine Reinigung der daraus hergestellten wässerigen Lösung durch Alkoholfällung unterblieb. Die Flüssigkeit wurde auf ihr Verhalten gegen Salpetersäure, Ferrocyankalium-Essigsäure und Millons Reagens, ferner mit der Biuretprobe geprüft. Sie verhielt sich dabei wie die aus dem Serum gewonnene Substanz. —

Die geringe Menge, in der die Substanz aus dem „Blutkörperchenbrei", also aus den mit Serum verunreinigten Blutkörperchen, gewonnen wurde, macht es wahrscheinlich, daß die gefundene Substanz nur im Serum enthalten war. —

Am 10. X. 01 starb der Patient. Bei der 21 Stunden nach dem Tode ausgeführten Sektion wurden 360 g Blut entnommen, mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit Chloroform und Thymol versetzt, mit Ammoniumsulfat kalt gesättigt und im übrigen in der unter „a" angegebenen Weise behandelt. Dabei wurde ebenfalls eine nicht koagulable Substanz erhalten, aber nur in so geringer Menge, daß sie sich nicht näher charakterisieren ließ.

Da bei der Untersuchung des nach dem Tode entnommenen Blutes nur Spuren, bei der Untersuchung des durch Venäsektion gewonnenen dagegen eine ziemlich erhebliche Menge einer albumosenartigen Substanz gefunden ist, die Untersuchungsmethode aber in beiden Fällen die gleiche war, erscheint ziemlich ausgeschlossen, daß die gefundene Substanz durch eine Zersetzung der koagulablen Eiweißkörper des Blutes bei den durch die Untersuchungsmethode bedingten Manipulationen entstanden ist. Trotzdem habe ich besondere Versuche angestellt, um die Zuverlässigkeit der Methode zu erproben.

Von dem Eiweißkoagulum, das durch Aufkochen der dialysierten Flüssigkeit bei neutraler Reaktion erhalten (siehe unter „a") und unter

Chloroformwasser aufgehoben war, wurde eine Portion mit 400 ccm Wasser im Kolben bei neutraler Reaktion aufgekocht und die Flüssigkeit durch ein „hartes“ Filter filtriert. Das Filtrat wurde durch Alkohol nicht getrübt. — Ferner wurde eine größere Portion des erwähnten Eiweißkoagulums mit 600 ccm Wasser verrieben, ein Teelöffel voll Ammoniumsulfat und etwas alkoholische Thymollösung zugesetzt und das Ganze im Kolben aufgekocht und filtriert. Das Filtrat wurde mit Essigsäure schwach angesäuert, wieder aufgekocht und filtriert. Abgesehen von einigen Papierfasern, erschien das Filtrat in einem Becherglase von 10 cm Durchmesser absolut klar. Durch das gleiche Volumen Alkohol absolutus wurde es nicht im geringsten getrübt. Zusatz von Essigsäure und Ferrocyankalium bewirkte auch nach längerer Zeit keine Trübung. Die Biuretreaktion war völlig negativ. Die Hauptmenge der Flüssigkeit wurde mit Ammoniumsulfat in der Kälte gesättigt und filtriert, das Filter mit einer kleinen Menge Wasser ausgespült und diese Flüssigkeit aufgekocht und filtriert. Das Filtrat gab beim Erhitzen mit Salpetersäure eine schwache Gelbfärbung; die Biuretprobe fiel dagegen negativ aus.

Weiterhin habe ich geprüft, ob das zugesetzte Thymol zu Täuschungen Anlaß geben kann. Eine große Messerspitze voll kristallisierten Ovalbumins, das durch Absaugen von der Mutterlauge möglichst befreit war, wurde in Wasser gelöst und die Lösung im Pergamentschlauch einige Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis die Außenflüssigkeit nur noch sehr geringe Schwefelsäurereaktion gab. Der Schlauchinhalt wurde mit einer Lösung von 2 g Thymol in 8 g Alkohol vermischt. Von dem entstandenen reichlichen Niederschlage wurde nach 48 Stunden die überstehende Flüssigkeit abgegossen, der Niederschlag mit Alkohol geschüttelt, der Alkohol abfiltriert und der Niederschlag auf dem Filter mit Alkohol ausgewaschen. Der Niederschlag hatte keinen Thymolgeruch. Er wurde mit 200 ccm Wasser verrieben, unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure aufgekocht und die Flüssigkeit heiß filtriert. Nach dem Erkalten wurde nochmals filtriert. Das klare Filtrat gab keine Biuretreaktion. Die Essigsäure-Ferrocyankalium-Reaktion zeigte eine Spur der Koagulation entgangenen Eiweißes an. Die Hauptmenge der Flüssigkeit wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt, wobei nur eine feine Trübung entstand. Nach 24stündigem Stehen wurde die Flüssigkeit filtriert und das Filter mit heißem Wasser ausgelaugt. Eine albumosenartige Substanz ließ sich nicht nachweisen. —

An dieser Stelle muß daran erinnert werden, daß das Thymol bei einigen Eiweiß- resp. Albumose-Reaktionen stören kann. In besonderen Versuchen konnte ich bei Thymollösungen durch Erhitzen mit Millons Reagens Rotfärbung, durch Erhitzen mit Salpetersäure Gelbfärbung mit unmittelbar folgender Trübung erhalten. Man entfernte daher das Thymol durch Anwendung von Alkohol. —

Die mitgeteilten Erfahrungen geben keinen Grund zu der Annahme, daß die von mir bei chronischer Nephritis aus dem Blute isolierte Substanz durch Zersetzung koagulabler Eiweißstoffe bei den durch die Untersuchungsmethode bedingten Manipulationen entstanden ist. —

Der positive Befund bei dem Falle von Nephritis veranlaßte mich, auch bei anderen Krankheiten das Blut auf Albumosen zu prüfen. Da sich die Gelegenheit bot, untersuchte ich zunächst das Blut einer an perniziöser Anämie gestorbenen Frau. Der

Tod erfolgte am 26. X. 01. $1^1/_4$ Stunden nach dem Tode wurden 307 g Blut entnommen und in einem sterilen Kolben aufgefangen. Nach kurzer Zeit trat Gerinnung ein; die Abscheidung des Serums aus dem Blutkuchen erfolgte rasch. Eine halbe Stunde nach Eintritt der Gerinnung ließen sich schon 230 g und nach weiteren $1^1/_4$ Stunden noch 43 g Serum abgießen. Der Blutkuchen im Gewichte von 34 g wurde dann mit der gleichen Menge Wasser verrieben und mit Ammoniumsulfat in der Kälte gesättigt. Die Hauptmenge des Serums, reichlich 200 g, wurde ebenfalls mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und mit Ammoniumsulfat gesättigt.

Ein Teil des Serums wurde zu einigen quantitativen Bestimmungen verwandt. Dabei wurden folgende Werte erhalten:

Gesamtstickstoff	1,064 Proz.
Gesamteiweißstoffe	6,02 „
Globulin	2,25 „

Belege: Bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl erforderten zur Bindung des entwickelten Ammoniaks

a) 5 ccm Serum 3,8 ccm N-H_2SO_4 ⎫
b) 5 „ „ 3,8 „ N-H_2SO_4 ⎭ = 0,0532 g N.

10 ccm Serum, mit 40 ccm Wasser verdünnt, mit Magnesiumsulfat bei 17° gesättigt, Niederschlag auf gewogenem Filter gesammelt, mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen, bei 115° getrocknet, mit heißem Wasser, Alkohol, Äther gewaschen, bei 115° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gaben 0,2275 g Globulin, darin 0,0024 g Asche.

10 ccm Serum mit 70 ccm Alkohol absolutus gefällt, Niederschlag auf gewogenem Filter gesammelt, mit Alkohol, Äther gewaschen, bei 115° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gaben 0,6150 g Gesamteiweißstoffe, darin 0,0132 g Asche.

Die weitere Verarbeitung von Blutkuchen und Serum erfolgte in der gleichen Weise wie bei dem nephritischen Blut. Der Nachweis einer wenn auch nur geringen Menge albumosenartiger Substanz gelang weder beim Serum noch beim Blutkuchen.

Gleichfalls mit negativem Erfolge habe ich das Blut eines gesunden Mannes untersucht, der sich erschossen hatte. Es war kurze Zeit nach dem Tode aus dem Herzen entnommen und steril aufgefangen worden. Eine gesonderte Untersuchung von Serum und Blutkuchen wurde nicht ausgeführt, vielmehr wurden 300 ccm des Blutes nach 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank als Ganzes verarbeitet. Eine albumosenartige Substanz habe ich daraus nicht isolieren können. Dieses Ergebnis spricht zwar nicht dafür, daß im Blute des gesunden Menschen Albumosen in irgend erheblicher Menge vorkommen; indessen bedarf es zur Entscheidung dieser Frage wiederholter Untersuchungen. —

Das zu dieser Untersuchung benutzte Material wurde mir von den Herren Dr. E. Fraenkel, Prosektor am Eppendorfer Krankenhause, Dr. Reuter, Prosektor am Hafenkrankenhause, Dr. Kißling, Assistenzarzt an der Direktorialabteilung (Chef: Herr Prof. Dr. Lenhartz) freundlichst zur Verfügung gestellt. Den genannten Herren sage ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank. —

Literaturverzeichnis.

1. Embden und Knoop, Diese Beiträge, **3**, 120 (1903).
2. Langstein, Diese Beiträge, **3**, 373 (1903).
3. Matthes, Berliner Klin. Wochenschrift 1894.

XXXVI.

Beiträge zur vergleichenden Physiologie des Hungerstoffwechsels.

Von Dr. med. **B. Slowtzoff.**

Zweite Mitteilung: Der Hungerstoffwechsel der Weinbergschnecke.

Im Laufe des vorigen Winters habe ich eine Anzahl im April 1902 in der Umgegend von Heidelberg gesammelter Schnecken chemisch untersucht. Die Tatsachen, die ich in der Mitteilung über das Hungern der Insekten*) zusammengestellt habe, machen es wünschenswert, auch die an den Schnecken gewonnenen Zahlen mitzuteilen. Diese Tiere haben Gehäuse, die als Analogon der Gerüstsubstanz anderer Tiere anzusehen sind, und es lag nahe, deren Verhalten beim Hungern zu verfolgen. Ich habe deswegen nicht nur die Weichteile, sondern auch die Gehäuse auf Wasser-, Asche- und Stickstoffgehalt untersucht und das Verhalten der wasserlöslichen anorganischen Bestandteile (Kalium- und Natriumsalze) zu den wasserunlöslichen (Magnesium- und Kalziumverbindungen) festgestellt.

Die Trockensubstanz der Tiere wurde, wie in meiner vorigen Arbeit beschrieben worden ist, auf Äther-, Äther-Alkohol- und Wasserextrakt, sowie auf Aschengehalt untersucht. Da die Schnecken beim Invertieren eine große Menge reduzierender Substanz liefern, habe ich die Menge der letzteren quantitativ nach Allihn bestimmt. (Das Invertieren wurde mit 5 proz. Schwefelsäure vorgenommen und dauerte 24 Stunden.) Der Pentosengehalt wurde aus der Menge des Phlorglucidniederschlages (nach Tollens) mit Hilfe der Kröberschen Formel berechnet. Für meine speziellen Zwecke war es am wichtigsten, die Verteilung des Stickstoffes und Phosphors in den verschiedenen Extrakten zu bestimmen. Der Stickstoff der Eiweißkörper wurde als Rest durch Subtrahieren der Stickstoffmenge der verschiedenen Extrakte von dem Gesamtstickstoff berechnet. Der Phosphor der Eiweißkörper wurde als Rest berechnet, aber auch direkt bestimmt. Die Zahlen stimmten gut überein.

*) Diese Beiträge **4**, 23.

Die gesammelten Schnecken (Helix pomacea) wurden in einen mit Laub und Gras gefüllten Kasten gelegt und am andern Tage in zwei möglichst gleiche Gruppen geteilt. Dies war nötig, weil die Tiere ihrer Größe nach sehr verschieden waren. Es gelang uns, die Tiere in zwei annähernd gleiche Gruppen zu teilen; die erste (Kontrolltiere) bestand aus 17 Tieren, die 371,1 g wogen (Mittel 21,83 g), die zweite (Karenztiere) aus 18 Stück mit dem Gesamtgewicht 392,9 g (Mittel 21,83 g.)

Die Karenztiere wurden in einen ganz trockenen Kasten gelegt und jeden Tag bis zum Tode einzeln gewogen. Die Kontrolltiere wurden getötet, die Gehäuse abpräpariert und für sich gewogen. So konnten wir die Gewichte der Gesamttiere, der Gehäuse und der Weichteile (Schneckenleiber) feststellen und das mittlere Verhalten der beiden Teile bestimmen. Die Zahlen sind in der Tabelle I zusammengestellt. Die Weichteile wurden in 95proz. Alkohol bis zur chemischen Bearbeitung aufbewahrt, die Schalen sogleich auf Wasser- und Aschengehalt untersucht. Die Bearbeitung der Karenztiere geschah in derselben Weise.

Tabelle I.

Gewicht des ganzen Tieres in g	Gewicht des Gehäuses in g	Gewicht der Weichteile in g
21,8	8,4	13,4
19,7	5,3	14,4
26,5	10,0	16,5
22,8	9,4	13,4
20,2	6,8	13,4
18,6	6,8	11,8
21,8	7,4	14,4
25,4	11,0	14,4
27,0	9,4	17,6
21,8	11,6	10,2
17,6	7,4	10,2
21,2	7,8	13,4
20,7	9,4	11,3
17,6	6,3	11,3
22,3	10,0	12,3
23,3	9,3	14,0
22,8	8,4	14,4

Aus der Tabelle ersieht man, daß das Gewicht der Gehäuse 144,7 g und das Gewicht der Weichteile 226,4 g ausmacht. Im Mittel wiegt die ganze Schnecke 21,83 g, ihr Gehäuse 8,51 g (38,99 Proz. des Gesamtgewichtes), das Tier selbst (die Weichteile) 13,32 g (61,01 Proz).

Die Gewichte der Karenztiere sind in der Tabelle II angegeben.

Tabelle II.

Gewicht des ganzen Tieres in g	Gewicht des Gehäuses in g	Gewicht der Weichteile in g
17,0	7,0	10,0
18,8	7,3	11,5
14,0	5,0	9,0
16,9	5,9	11,0
14,4	4,4	10,0
14,7	4,7	10,0
13,7	4,7	9,0
18,0	7,0	11,0
14,6	5,6	9,0
16,0	7,0	9,0
13,1	5,1	8,0
17,8	7,8	10,0
15,2	4,2	11,0
14,0	4,5	9,5
14,9	4,9	10,0

Wir sehen also, daß die Karenztiere (15 Stück*) im Augenblick des Todes 233,1 g wogen, davon entfielen 148 g (63,49 Proz.) auf die Weichteile und 85,1 g (36,51 Proz.) auf die Gehäuse. Im Mittel wiegt das Karenztier 16,21 g, sein Gehäuse 6,34 g und der Schneckenleib 9,87 g.

Tabelle III.

Mittleres Gewicht	Vor dem Hungern	Nach dem Hungern	Verlust in Proz. des ursprünglichen Gewichtes
des ganzen Tieres	21,83	16,21	25,74 Proz.
der Schale	8,51	6,34	25,50 Proz.
der Weichteile	13,32	9,87	25,90 Proz.

*) Während des Versuches gingen 3 Tiere verloren. Deswegen sind in die Tabelle II und IV nur 15 Stück aufgenommen.

Tabelle IV.

Datum und Monat des Versuchs	Gesamtgewicht d. 15 Schnecken in g	Absoluter Gewichtsverlust in g	Absoluter Gewichtsverlust in Proz.	Täglicher Gewichtsverlust in Proz.	Datum und Monat des Versuchs	Gesamtgewicht d. 15 Schnecken in g	Absoluter Gewichtsverlust in g	Absoluter Gewichtsverlust in Proz.	Täglicher Gewichtsverlust in Proz.	Datum und Monat des Versuchs	Gesamtgewicht d. 15 Schnecken in g	Absoluter Gewichtsverlust in g	Absoluter Gewichtsverlust in Proz.	Täglicher Gewichtsverlust in Proz.	Datum und Monat des Versuchs	Gesamtgewicht d. 15 Schnecken in g	Absoluter Gewichtsverlust in g	Absoluter Gewichtsverlust in Proz.	Täglicher Gewichtsverlust in Proz.
20/IV.	357,4	0	0	0	5/V.	295,1	62,3	17,43	0,78	20/V.	263,2	94,2	26,36	0,28	4/VI.	252,1	105,3	29,46	0,03
21/IV.	335,4	22,0	6,16	6,16	6/V.	291,6	66,8	18,69	1,26	21/V.	256,0	101,4	28,37	2,01	5/VI.	252,1	105,3	29,46	0,00
22/IV.	329,4	28,0	7,83	1,67	7/V.	288,1	69,3	19,39	0,70	22/V.	254,4	103,0	28,82	0,45	6/VI.	251,4	106,0	29,66	0,20
23/IV.	323,2	34,2	9,57	1,74	8/V.	284,3	73,1	20,45	1,06	23/V.	254,3	103,1	28,85	0,03	7/VI.	251,2	106,2	29,71	0,05
24/IV.	320,3	37,1	10,38	0,81	9/V.	280,2	77,2	21,60	1,15	24/V.	254,2	103,2	28,88	0,03	8/VI.	251,0	106,4	29,77	0,06
25/IV.	319,0	38,4	10,74	0,36	10/V.	278,9	78,5	21,97	0,37	25/V.	254,1	103,3	28,90	0,02	9/VI.	251,0	106,4	29,77	0,00
26/IV.	313,0	44,4	12,42	1,68	11/V.	277,2	80,2	22,44	0,47	26/V.	254,0	103,4	28,93	0,03	10/VI.	250,6	106,8	29,88	0,11
27/IV.	311,0	46,4	12,98	0,56	12/V.	276,2	81,2	22,72	0,28	27/V.	253,9	103,5	28,96	0,03	11/VI.	250,6	106,8	29,88	0,00
28/IV.	310,0	47,4	13,26	0,28	13/V.	274,2	83,2	23,28	0,56	28/V.	253,9	103,5	28,96	0,00	12/VI.	250,5	106,9	29,91	0,03
29/IV.	309,0	48,4	13,54	0,28	14/V.	272,3	85,1	23,81	0,53	29/V.	253,1	104,3	29,18	0,22	13/VI.	250,4	107,0	29,94	0,03
30/IV.	308,7	48,7	13,63	0,09	15/V.	270,6	86,8	24,29	0,32	30/V.	252,9	104,5	29,24	0,06					
1/V.	305,1	52,3	14,63	1,00	16/V.	269,8	89,2	24,51	0,22	31/V.	252,6	104,8	29,32	0,08					
2/V.	302,6	54,8	15,33	0,70	17/V.	268,2	89,6	24,95	0,44	1/VI.	252,2	105,2	29,43	0,09					
3/V.	299,3	58,1	16,25	0,92	18/V.	267,8	93,2	25,07	0,12	2/VI.	252,2	105,2	29,43	0,00					
4/V.	297,9	59,5	16,65	0,40	19/V.	264,2	94,2	26,08	1,01	3/VI.	252,2	105,2	29,43	0,00					

Die Zusammenstellung der mittleren Gewichte der Kontroll- und Karenztiere in Tabelle III zeigt, daß die Gehäuse beim Hungern in demselben Maße wie die Weichteile angegriffen werden. Wir können deshalb nicht annehmen, daß die Gehäuse eine inerte, fast leblose Masse sind, die vom Organismus nur als Schutzdecke ausgeschieden wird, sondern sie sind ein Gewebe, das beim Mangel genau wie die übrigen Teile Not leidet.

Die mittlere Kurve des Gewichtsverlustes bei absoluter Karenz läßt sich aus den Bestimmungen des täglichen Gesamtgewichts der Karenztiere erhalten. Die Gewichtsverluste der einzelnen Tiere folgen, wie ich mehrmals durch Vergleich ermittelt habe, im ganzen derselben Kurve, und es wäre zwecklos, die individuellen Schwankungen näher anzuführen.

Aus der Tabelle IV ersieht man, daß die Schnecken fast 51 Tage ohne Nahrung bleiben können. Dabei werden fast 30 Proz. des ursprünglichen Gewichtes verbraucht. Was die täglichen Gewichtsverluste betrifft, so kann man das ganze Leben der Karenztiere in drei Perioden teilen. Während der ersten (19 Tage) ist der mittlere Gewichtsverlust im Mittel 1,14 Proz., während der zweiten (13 Tage) beträgt derselbe nur 0,55 Proz., während der letzten nimmt er bis 0,05 Proz. ab. Somit wird der tägliche Verlust immer kleiner und kleiner. Eine prämortale Steigerung des Zerfalls, wie bei Maikäfern und höheren Tieren, ist hier nicht festzustellen. Vom 14. bis 15. Tage des Hungerns suchen die Tiere den Wasserverlust zu vermindern, indem sie den Eingang des Gehäuses mit einer dünnen Schichte von Mucin verkleben. Da ich den möglichst schnellen Tod erzielen und die Wasserverluste möglichst normal machen wollte, so zerriß ich jeden Tag diese Häutchen. Bis zum letzten Tag konnten die Tiere sich bewegen, ließen bei Berührung ein schaumartiges Sekret austreten und reagierten auf mechanische und chemische Reize durch Zusammenziehen ihres Bauchmuskels. Die Reaktion schien sich etwas langsamer fortzupflanzen, doch habe ich zu spärlich direkte Messungen ausgeführt, um sie hier mitzuteilen. Die Gehäuse wurden allmählich durchsichtiger und brüchiger.

Die Resultate der chemischen Untersuchung stelle ich in den nachstehenden Tabellen, und zwar getrennt für Gehäuse und für Weichteile, zusammen.

Tabelle V.

Gehäuse.

	Normaltiere		Karenztiere	
	in der frischen Substanz Proz.	in der Trockensubstanz Proz.	in der frischen Substanz Proz.	in der Trockensubstanz Proz.
Wasser	0,84	0	1,04	—
Trockensubstanz	99,16	100,00	98,96	100,00
OrganischeSubstanz	45,01	45,39	43,61	44,07
Gesamt-Stickstoff	0,255	0,257	0,255	0,258
Gesamt-Asche	54,15	54,60	55,35	55,93
Wasserlösl. Asche	2,64	2,66	3,21	3,24
Wasserunlösl. Asche	51,51	51,94	52,14	52,69

Man bemerkt schon bei flüchtiger Durchsicht der angeführten Zahlen, daß die Zusammensetzung der Schalen, selbst wenn sie während der Inanition ein Drittel ihres Gewichtes verloren haben, sich kaum geändert hat. Der Gehalt an Stickstoff ist absolut der gleiche. Auch das Verhältnis von Asche und organischer Substanz ist konstant, beim Normaltiere $\frac{54,15}{45,01} = 1,26$, beim Karenztiere $\frac{55,92}{43,61} = 1,27$. Es scheint also, daß bei der absoluten Karenz das Gehäuse der Schnecken in toto einschmilzt und daß bei dem Verbrauch organische Substanz und Aschenbestandteile in gleichem Maße abgegeben werden. Um eine zutreffende Vorstellung über den absoluten Verbrauch der verschiedenen Bestandteile der Gehäuse zu gewinnen, ist es nötig, die Zahlen der Tabelle V auf eine bestimmte Zahl von Individuen zu beziehen. Das Ergebnis einer solchen Berechnung ist aus Tabelle VI ersichtlich. (Siehe Tabelle VI auf folgender Seite.)

Die angeführten Zahlen zeigen noch deutlicher als die früher angeführten, daß bei der Karenz die Verluste der Gehäuse sich gleichmäßig auf organische und anorganische Substanz verteilen und daß bloß der Wassergehalt und die Menge der wasserlöslichen Salze ungefähr gleich bleibt.

Wenn sich schon die Gehäuse beim Hungern so bedeutend verändern, so ist zu erwarten, daß die Weichteile noch stärker angegriffen werden. Tabelle VII zeigt uns die Zusammensetzung der Weichteile von Normal- und Karenztieren.

Tabelle VI.

	Frische Substanz	Wasser	Trocken-substanz	Stickstoff	Organische Substanz	Asche	Wasser-lösliche Asche	Wasser-unlösliche Asche
10 Stück Normal-Schneckengehäuse enthalten g	85,1	0,72	84,38	0,22	38,30	46,08	2,24	43,84
10 Stück Karenz-Schneckengehäuse enthalten g	63,4	0,66	62,74	0,16	27,65	35,09	2,03	33,06
Absoluter Gewichtsverlust in g	21,7	0,06	21,64	0,06	10,65	10,99	0,21	10,78
Gewichtsverlust in Proz. der ursprünglichen Menge	−25,74	−8,33	−25,65	−27,47	−27,81	−23,85	−9,37	−24,59

Wie oben erwähnt, ist der Eiweißgehalt der Schneckenleiber nicht direkt bestimmt worden. Wir verstehen darunter den Rest der organischen Substanz nach Extrahieren mit Äther, Alkohol und Wasser und nach Subtrahieren der Zuckermenge, die aus der Trockensubstanz durch Invertieren mit 5proz. Schwefelsäure erhalten wurde. Die berechnete Menge der Eiweißkörper stellt somit nur einen Näherungswert dar, zumal da das Invertieren auch Zucker aus Eiweißkörpern (Mucin) abspaltet. Da aber die Berechnung in den beiden Reihen der Untersuchung dieselbe Näherung ist, so dürfte es gestattet sein, auch diese Zahlen zu verwerten. (Siehe Tabelle VII auf folgender Seite.)

Die Zusammensetzung der Schneckenleiber verändert sich beim Hungern beträchtlich. Die Menge der Trockensubstanz steigt bedeutend an (von 17,86 Proz. auf 22,44 Proz.), was natürlich von Wasserverdunstung bedingt ist. Die Oxydationsprozesse haben den Fett- und Kohlehydratgehalt bis auf ein Minimum, 0,05 Proz. für Zucker und 0,27 Proz. für Fett, vermindert.

Die merkwürdigste Erscheinung bei den Karenztieren ist eine beträchtliche Vermehrung der wasserunlöslichen Salze (bzw. der Kalzium- und Magnesiumverbindungen), die aus der Verminderung des Gewichts nicht erklärt werden kann. Die natürlichste Erklärung dieser Tatsache ist darin zu suchen, daß bei dem Einschmelzen der Gehäuse ein Teil der wasserunlöslichen Salze in den Leib zurücktritt und nicht ausgeschieden wird. Um eine zutreffende Vorstellung über den absoluten Verbrauch von Fett, Kohlehydrat und anderen Bestandteilen des Schneckenleibes zu ermöglichen, haben wir die Zahlen der Tabelle VII auf je zehn Stück Tiere berechnet. (Siehe Tabelle VIII auf Seite 468.)

Tabelle VII.
Schneckenleiber.

	Normaltiere		Karenztiere	
	Trockensubstanz in Proz.	Frische Substanz in Proz.	Trockensubstanz in Proz.	Frische Substanz in Proz.
Wasser	0	82,14	0	77,56
Trockensubstanz	100,00	17,86	100,00	22,44
Gesamt-Asche	11,28	2,01	8,84	1,98
Wasserlösliche Asche	6,36	1,26	1,64	0,36
Wasserunlösliche Asche	4,92	0,75	7,20	1,62
Organische Substanz	88,72	15,85	91,16	20,46
Ätherextrakt (Fett, Lecithin usw.)	5,08	0,91	1,20	0,27
Alkoholextrakt	2,56	0,46	0,55	0,12
Wasserextrakt	14,48	2,59	37,51	8,42
Zucker (als Glykose berechnet)	3,50	0,63	0,22	0,05
Eiweißkörper	63,10	11,26	51,68	11,60
Pentosen	0,99	0,17	1,18	0,26

Die Verluste der verschiedenen Substanzen können somit in folgende Reihe gebracht werden: Kohlehydrate (93,98 Proz.), Fette (78,51 Proz.), Alkoholextrakt (80,30 Proz.), wasserlösliche Asche (76,10 Proz.), Wasser (30,02 Proz.), Gesamtasche (27,24 Proz.) und Eiweißkörper (23,70 Proz.) Die Trockensubstanz hat sehr wenig eingebüßt (6,89 Proz.), die Vermehrung der Pentosen fällt in die Fehlergrenzen. Der Abbau der Eiweißkörper ruft eine Verdoppelung der Menge der Extraktivstoffe (141,50 Proz.) hervor, die Menge der unlöslichen Salze wird um mehr als ein Drittel erhöht.

Der absolute Verlust an organischen Substanzen gestattet uns, eine Vorstellung über die Energieeinbuße zu gewinnen, obgleich der kalorische Wert der organischen Substanz des Gehäuses nur annähernd geschätzt werden kann.

Vielleicht kann man es als ein Gemenge von Glutin und chitinartigen Substanzen ansehen und das kalorische Äquivalent im

Tabelle VIII.

	10 Stück Normaltiere enthalten g	10 Stück Karenztiere enthalten g	Absoluter Gewichts-verlust in g	Gewichts-verlust in Proz. der ursprünglichen Menge
Wasser	109,41	76,55	32,86	— 30,02
Trockensubstanz	23,79	22,15	1,64	— 6,89
Gesamt-Asche	2,68	1,95	0,73	— 27,24
Wasserlösliche Asche	1,51	0,36	1,15	— 76,10
Wasserunlösliche Asche	1,17	1,59	0,42	+ 35,90
Organische Substanz	21,11	20,20	0,91	— 4,31
Ätherextrakt (Fett, Lecithin usw.)	1,21	0,26	0,95	— 78,51
Alkoholextrakt	0,61	0,12	0,49	— 80,30
Wasserextrakt	3,44	8,31	4,87	+ 141,50
Kohlehydrate (als Glykose berechnet)	0,83	0,05	0,78	— 93,98
Eiweiß	15,02	11,46	3,56	— 23,70
Pentosen	0,23	0,25	(+ 0,02)	(+ 8,69)
Gesamt-Gewicht	133,20	98,70	34,5	25,90

Mittel aus den kalorischen Werten der Eiweißkörper und Kohlehydrate zu annähernd 4,20 Kal. pro 1 g Substanz annehmen. Die anderen kalorischen Äquivalente werden wie gewöhnlich angenommen. Die Berechnung der organischen Substanz als Konchiolin würde an der Berechnung nicht viel ändern.

Der absolute Verlust der Leibessubstanz von zehn Schnecken wird zu 0,95 g Fett, 5,36 g Extraktivstoffe, 0,78 g Kohlehydrat und 3,56 g Eiweißkörper angenommen. Der Verlust an organischer Substanz der Gehäuse ist zu 10,65 g bestimmt. Kalorisch berechnet, gibt das folgende Zahlen:

9,46 Kal.	×	0,95	=	8,987	Kal.
4,18 „	×	0,78	=	3,2604	„
4,32 „	×	3,56	=	15,3792	„
4,20 „	×	10,65	=	44,730	„
			Summa	72,3566	Kal.

Um aber einen richtigen Wert des Energieverlustes zu bekommen, muß man diese Summe um den Kalorienwert der bei dem Zerfall ge-

bildeten Extraktivstoffe vermindern, deren Menge zu 4,87 g berechnet ist. Ihr Kaloriewert ist somit = 3,154 Kal. × 4,87 = 15,3610 Kal.

Der wirkliche Energieverbrauch wäre danach 72,3566 — 15,3610 Kal. = 56,9956 Kal. pro 54 Tage des Hungerns und pro 218,3 g des Lebendgewichtes. Das macht pro Tag und 10 Stück 1,0555 Kal., pro Tag und Kilo 4,8397 Kal., pro Stunde und Kilo 0,2016 Kal.

Den kalorischen Wert der Normaltiere kann man aus ihrer Zusammensetzung berechnen. Sie enthalten 38,30 g organischer Substanz in den Gehäusen, 1,21 g Fett, 15,02 g Eiweißkörper, 0,83 g Kohlehydrate, 4,05 g Extraktivstoff. Das macht:

3,154	Kal.	× 38,3	=	120,7982	Kal.
9,46	„	× 1,21	=	11,4466	„
4,32	„	× 15,02	=	64,8864	„
4,18	„	× 0,83	=	3,4694	„
			Summa	200,6006	Kal.

Davon wurden beim Hungern 56,9956 Kal. verbraucht, was ungefähr 28,41 Proz. der ursprünglichen Kalorienmenge ausmacht.

Um einen Überblick über die Gesamt-Verluste der Schnecken (Gehäuse und Leiber) zu vermitteln, will ich nachstehend die hierher gehörigen Zahlen in Tabelle IX zusammenstellen.

Tabelle IX.

	10 Stück Normaltiere enthalten in g	10 Stück Karenztiere enthalten in g	Absoluter Gewichtsverlust in g	Gewichtsverlust in Proz. der ursprünglichen Menge
Gesamt-Gewicht	218,30	162,10	56,20	— 25,74
Wasser	110,13	77,21	32,92	— 29,21
Trockensubstanz	108,17	84,89	23,28	— 21,52
Gesamt-Asche	48,76	37,04	11,72	— 24,03
Wasserlösliche Asche	3,75	2,39	1,36	— 36,27
Wasserunlösliche Asche	45,01	34,65	10,36	— 23,02
Organische Substanz	59,41	47,85	11,56	— 19,46

Der Hauptverlust fällt auf die wasserlöslichen Salze, von denen ein Drittel (36,27 Proz.) ausgeschieden wird; die organische Substanz wird sehr wenig vermindert. Die Verluste an anderen Bestandteilen schwanken zwischen 29,21 Proz. und 21,52 Proz.

Die beobachteten Tatsachen zeigen uns, daß beim Hungern fast ein Fünftel aller Eiweißkörper der Leibessubstanz zerfällt.

Es schien interessant, die Menge der zerfallenen phosphorhaltigen organischen Stoffe zu bestimmen.

Die Hauptresultate der Stickstoff- und Phosphorbestimmungen in verschiedenen Extrakten der Leibessubstanz sind in den Tabellen X, XI, XII und XIII zusammengestellt.

Tabelle X.

	Normaltiere			Karenztiere		
	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	In Prozent ausgedrückt	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	In Prozent ausgedrückt
Gesamt-Stickstoff	8,915	1,592	100,00	9,430	2,116	100,00
Stickstoff des Äther- und Alkoholextraktes	0,843	0,151	9,46	0,390	0,087	4,14
Stickstoff des Wasserextraktes	1,161	0,207	13,02	3,225	0,724	33,42
Eiweißstickstoff	6,911	1,234	77,52	5,815	1,305	62,44

Tabelle XI.

	Gesamt-Stickstoff	Stickstoff des Äther- u. Alkoholextraktes	Stickstoff des Wasserextraktes	Eiweißstickstoff
In 10 Stück Normaltieren	2,121	0,201	0,276	1,644
In 10 Stück Karenztieren	2,089	0,086	0,714	1,289
Absolute Veränderung	0,032	0,115	0,438	0,355
Veränderung in Proz.	— 1,51 Proz.	— 57,22 Proz.	+ 158,70 Proz.	— 21,59 Proz.

Tabelle XII.

	Normaltiere			Karenztiere		
	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	In Proz. ausgedrückt	Proz.-Gehalt der Trockensubstanz	Proz.-Gehalt der frischen Substanz	In Proz. ausgedrückt
Gesamt-P_2O_5	2,569	0,459	100,00	2,128	0,477	100,00
P_2O_5 des Äther- und Alkoholextraktes	0,271	0,048	10,55	0,182	0,041	8,55
P_2O_5 des Wasserextraktes	0,812	0,145	31,61	0,652	0,146	30,64
P_2O_5 der Eiweißkörper	1,486	0,266	57,84	1,294	0,290	61,81

Tabelle XIII.

	Gesamt-P_2O_5	P_2O_5 des Alkohol-Äther-extraktes	P_2O_5 des Wasser-extraktes	P_2O_5 der Eiweißkörper
10 Stück Normaltiere enthalten g	0,611	0,065	0,193	0,353
10 Stück Karenztiere enthalten g	0,471	0,041	0,145	0,285
Absolute Veränderung	0,140	0,024	0,048	0,068
Veränderung in Proz.	— 22,91	— 29,31	— 24,87	— 19,29

Die Tabellen X und XI lehren, daß beim Hungern der Gehalt verschiedener Extrakte an Stickstoff sich stark verändert. Der Stickstoff des Ätheralkoholextraktes wird um 57,22 Proz. vermindert, der Stickstoff der Eiweißkörper um 21,59 Proz. Die letztere Zahl stimmt gut mit der Verminderung der Eiweißkörper (siehe Tabelle VIII 23,70 Proz.). Der Stickstoff der Extraktivstoffe wird bedeutend vermehrt (um 158,7 Proz.), was auch der Vermehrung der Extraktivstoffe im allgemeinen (141,50 Proz.) entspricht.

Die Veränderungen des Phosphorsäuregehaltes sind nicht groß. Der Prozentgehalt bleibt nahezu der gleiche. Die Abspaltung des Phosphors aus den Eiweißkörpern, die auf den Zerfall der Nucleine und Nucleoalbumine hindeutet, beträgt 19,29 Proz. Bei Schnecken geht also der Verbrauch der Eiweißkörper dem Zerfalle der phosphorhaltigen Eiweißkörper parallel. Die Pentosen bleiben aber, so wie es schon früher an Maikäfern festgestellt wurde, beim Hungern ganz unverändert.

Wenn wir die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassen, so kommen wir zu folgenden Schlüssen.

1. Bei absoluter Karenz verbrauchen die Schnecken 25,74 Proz. des Gesamtgewichtes und etwa 28,41 Proz. ihres gesamten Energievorrates.

2. Die täglichen Gewichtsverluste nehmen allmählich ab. Eine prämortale Steigerung scheint nicht einzutreten.

3. Die Gewichtsverluste beziehen sich nicht nur auf die Leibessubstanz, sondern auch auf die Gehäuse, welche fast 25,50 Proz. ihres ursprünglichen Gewichtes verlieren.

4. Bei den Gehäusen werden gleichmäßig alle Bestandteile vermindert. Nur das Wasser und wasserlösliche Salze scheinen sich sehr wenig zu verändern. Das Verhältnis der organischen

zur unorganischen Substanz bleibt in den Gehäusen der Normal- und Karenztiere dasselbe.

5. Die Verluste der Leibessubstanz der Schnecken betreffen vorzugsweise Fette, Kohlehydrate und Wasser.

6. Die Verluste zeigen folgende Reihenfolge: Kohlehydrate (93,98 Proz.), Fette (78,51 Proz.), Wasser (30,02 Proz.), Gesamtasche (27,24 Proz.) und Eiweißkörper (berechnet) (23,70 Proz.).

7. In den Weichteilen erfolgt beim Hungern eine Vermehrung der wasserunlöslichen Salze (bis 35,9 Proz.).

8. Während des Hungerns verbrauchen die Schnecken pro 24 Stunden und pro Kilo 4,84 Kal., pro Stunde und Kilo 0,202 Kal.

9. Die phosphorhaltigen Eiweißkörper werden mäßig angegriffen, so daß nur etwa 19 Proz. des Eiweißphosphors abgespalten wird. Die Menge der Pentosen scheint sich nicht zu verändern.

Analytische Belege.

Kontrolltiere, Gehäuse.

Trockensubstanz bei 110° C.

8,2642 g	8,1962 g	= 99,18 Proz.
4,0558 g	4,0208 g	= 99,14 „
		Mittel 99,16 Proz.

Gesamtasche.

0,5382 g	0,2910 g	= 54,07 Proz.
0,7260 g	0,3938 g	= 54,24 „
		Mittel 54,155 Proz.

Wasserunlösliche Asche.

1,1296 g Asche, davon unlöslich	1,0742 g	= 95,10 Proz.
1,0840 g	1,0313 g	= 95,14 „
		Mittel 95,12 Proz.

Gesamtstickstoff.

1,2260 g	2,2 cc. 1/10 N-Säure	= 0,25 Proz.
1,0860 g	2,0 cc.	= 0,26 „
		Mittel 0,255 Proz.

Karenztiere, Gehäuse.

Trockensubstanz bei 110° C.

8,8678 g	8,7756 g	= 98,96 Proz.
0,0306 g	8,9368 g	= 98,96 „
		Mittel 98,96 Proz.

Gesamtasche.

0,7326 g	0,4050 g	= 55,28 Proz.
0,7604 g	0,4216 g	= 55,44 „
0,6460 g	0,3574 g	= 55,33 „
		Mittel 55,35 Proz.

Wasserunlösliche Asche.

0,3950 g Asche, davon unlöslich 0,3720 g . . . . = 94,18 Proz.
0,6035 g . . . . 0,5686 g . . . . = 94,22 „
Mittel 94,20 Proz.

Gesamtstickstoff.

1,5200 g . . . . 2,6 cc. $^1/_{10}$ N-Säure = 0,23 Proz.
1,1332 g . . . . 2,2 cc. . . . . . = 0,27 „
Mittel 0,25 Proz.

Kontrolltiere.

Ätherextrakt.

1,9467 g . . . . 0,0986 g . . . . = 5,07 Proz.
3,1048 g . . . . 0,1581 g . . . . = 5,09 „
Mittel 5,08 Proz.

Alkoholwasserextrakt.

3,8931 g . . . . 0,3387 g . . . . = 8,70 Proz.
2,7516 g . . . . 0,2362 g . . . . = 8,58 „
Mittel 8,64 Proz.

Wasserextrakt.

3,8931 g . . . . 0,5630 g . . . . = 14,46 Proz.
3,8621 g . . . . 0,5600 g . . . . = 14,50 „
Mittel 14,48 Proz.

Zuckerbestimmung.

0,4766 g . . . . 0,0162 g Glykose . = 3,40 Proz.
0,8030 g . . . . 0,0289 g „ . = 3,60 „
Mittel 3,50 Proz.

Gesamtasche.

1,3134 g . . . . 0,1486 g Asche . = 11,31 Proz.
1,3776 g . . . . 0,1550 g . . . . = 11,25 „
Mittel 11,28 Proz.

davon wasserunlöslich 0,0649 g = 4,94 Proz.
0,0676 g = 4,91 „
Mittel 4,925 Proz.

Pentosenbestimmung.

3,1098 g . . 0,0248 g Phlorglucidniederschl. = 0,0302 g Pentose
= 0,970 Proz.
2,5488 g . . 0,0201 g . . . . = 0,0257 g = 1,008 „
Mittel 0,989 Proz.

Gesamtstickstoff.

0,4922 g . . . . 31,3 cc. $^1/_{10}$ N-Säure = 8,90 Proz.
0,4200 g . . . . 26,8 cc. . . . . = 8,93 „
Mittel 8,915 Proz.

Stickstoff des Alkoholätherextraktes.

3,8931 g . . . . 2,2 cc. Säure . . = 0,809 Proz.
2,7516 g . . . . 1,725 cc. . . . . = 0,877 „
Mittel 0,843 Proz.

Stickstoff des Wasserextraktes.

6,5922	54,6 cc.	= 1,159 Proz.
2,7516	22,85 cc.	= 1,163 „
		Mittel 1,161 Proz.

Phosphor des Alkoholätherextraktes.

6,5922 g	0,0256 g $P_2Mg_2O_7$	= 0,248 Proz. P_2O_5
3,8931 g	0,0180 g . . .	= 0,294 „ P_2O_5
		Mittel 0,271 Proz. P_2O_5

Phosphor des Wasserextraktes.

6,5922 g	0,0846 g $P_2Mg_2O_7$	= 0,806 Proz. P_2O_5
0,7908 g	0,0100 g	= 0,818 „ P_2O_5
		Mittel 0,812 Proz. P_2O_5

Gesamtphosphor.

2,4870 g	0,1004 g $P_2Mg_2O_7$	= 2,574 Proz. P_2O_5
1,6332 g	0,0657 g	= 2,565 „ P_2O_5
		Mittel 2,569 Proz. P_2O_5

Phosphor der Eiweißkörper.

0,7908 g	0,0192 g $P_2Mg_2O_7$	= 1,548 Proz. P_2O_5

Karenztiere.

Ätherextrakt.

2,4216 g	0,0272 g	= 1,123 Proz.
2,5168 g	0,0323 g	= 1,283 „
		Mittel 1,203 Proz.

Alkoholätherextrakt.

3,4688 g	0,0592 g	= 1,707 Proz.
3,6962 g	0,0664 g	= 1,796 „
		Mittel 1,752 Proz.

Wasserextrakt.

3,4688 g	1,3028 g	= 37,55 Proz.
3,6962 g	1,3848 g	= 37,48 „
		Mittel 37,51 Proz.

Zuckerbestimmung.

0,6720 g	0,0014 g	= 0,208 Proz.
0,8180 g	0,0019 g	= 0,233 „
		Mittel 0,220 Proz.

Aschebestimmung.

0,6794 g	0,0598 g Gesamtasche . .	= 8,80 Proz.
0,5936 g	0,0528 g	= 8,89 „
		Mittel 8,845 Proz.
	davon wasserunlöslich 0,0487 g	= 7,17 Proz.
	0,0430 g	= 7,24 „
		Mittel 7,20 Proz.

Pentosenbestimmung.

2,4216 g .	0,0240 g Phlorglucidnied.	0,0296 g Pentose	= 1,19 Proz.
2,5168 g .	0,0242 g	0,0298 g . . .	= 1,18 „
			Mittel 1,185 Proz.

Gesamtstickstoff.

0,5590 g	37,7 cc. Säure	= 9,44 Proz.
0,8618 g	58,0 cc. Säure	= 9,42 „
	Mittel	9,43 Proz.

Stickstoff des Alkoholätherextraktes.

3,4688 g	0,8 cc. Säure . . .	= 0,40 Proz.
3,6922 g	1,0 cc.	= 0,38 „
	Mittel	0,39 Proz.

Stickstoff des Wasserextraktes.

3,6922 g	8,5 cc. Säure . . .	= 3,22 Proz.
3,4688 g	8,0 cc.	= 3,23 „
	Mittel	3,225 Proz.

Phosphor des Alkoholätherextraktes.

2,7554 g	0,0080 g $Mg_2P_2O_7$	= 0,185 Proz. P_2O_5
2,9360 g	0,0083 g	= 0,180 „ P_2O_5
	Mittel	0,1825 Proz. P_2O_5

Phosphor des Wasserextraktes.

3,4688 g	0,0352 g $Mg_2P_2O_7$	= 0,647 Proz. P_2O_5
3,6962 g	0,0380 g	= 0,657 „ P_2O_5
	Mittel	0,652 Proz. P_2O_5

Eiweißphosphor.

0,6973 g	0,0140 g $Mg_2P_2O_7$	= 1,280 Proz. P_2O_5
0,9038 g	0,0182 g	= 1,284 „ P_2O_5
	Mittel	1,282 Proz. P_2O_5

Gesamtphosphor.

0,9056 g	0,0302 g $Mg_2P_2O_7$	= 2,126 Proz. P_2O_5
0,8123 g	0,0272 g $Mg_2P_2O_7$	= 2,130 „ P_2O_5
	Mittel	2,128 Proz. P_2O_5

XXXVII.

Über das Plastein aus kristallisiertem Ovalbumin und über das Verhalten der Plasteinalbumosen zur Magen- und Dünndarmschleimhaut des Hundes.

Von **D. Kurajeff.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.

Die vorliegende Arbeit stellt eine Fortsetzung der von mir unternommenen Untersuchungen über die Plasteine und Koagulosen dar, d. h. über die Niederschläge, welche bei Einwirkung von Labextrakt und Papayotin auf Albumosengemenge entstehen.

Im folgenden teile ich die Resultate von Untersuchungen über das Plastein aus kristallisiertem Ovalbumin, sowie einige Versuche mit, die ich angestellt habe, um das Verhalten der Plasteinalbumosen zur Magen- und Dünndarmschleimhaut festzustellen.

I. Plasteine aus dem kristallisierten Ovalbumin.

Das kristallisierte Ovalbumin wurde genau nach der Methode von Hopkins aus 100 Eiern dargestellt und einmal umkristallisiert. Das gut abgepreßte Präparat wurde im Wasser gelöst, durch Kochen koaguliert und durch Waschen mit heißem Wasser vom Ammonsulfat befreit.

Zu 540 g gut abgepreßten geronnenen Albumins wurden 8 Liter Wasser, 135 ccm 25proz. Salzsäure und 2 g Pepsinum Grübler zugesetzt. Die Mischung wurde in den auf 40° C eingestellten Brutschrank gebracht. Nach drei Tagen wurden von der Flüssigkeit 6 Liter entnommen, der Rest weiterer Verdauung unterworfen. Die 6 Liter Verdauungsflüssigkeit wurden mit Soda neutralisiert, von einem geringen Niederschlage abfiltriert und auf dem Wasserbade auf 750 ccm eingedampft. Die erhaltene Albumosenlösung wurde unter häufigem Erhitzen zwei Monate lang aufbewahrt.

1. Darstellung des Plasteins A.

Zu 350 ccm der 15,2 Proz. feste Stoffe enthaltenden Albumosenlösung wurden 5 ccm 12,5proz. Salzsäure zugesetzt; dabei bildete sich ein geringer flockiger Niederschlag. Dann wurde die Flüssigkeit mit 100 ccm Wasser versetzt und nach einigen Stunden abfiltriert. Zum

klaren sauren Filtrat wurden 40 ccm etwa 3 proz. Lablösung*) zugesetzt und die Mischung in den Brutschrank bei 40° C gesetzt.

Schon nach einigen Minuten trübte sich die Flüssigkeit stark, und bald bildete sich ein starker feinflockiger weißer Niederschlag. Nach 36 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, abgepreßt und in 200 ccm Wasser zerteilt. Auf Zusatz von 180 ccm $\frac{N}{10}$-Natronlauge löste er sich vollständig. Die Flüssigkeit wurde abfiltriert, mit viel Wasser verdünnt und mit Salzsäure neutralisiert. Der gebildete, sehr voluminöse Niederschlag wurde abgepreßt und in 200 ccm Wasser verteilt. Auf Zusatz von einigen ccm $\frac{N}{10}$-Natronlauge löste er sich vollständig. Die alkalische Lösung wurde neuerlich mit viel Wasser verdünnt und mit Salzsäure gefällt**). Der voluminöse Niederschlag wurde lange Zeit mit Wasser, darauf mit kaltem und heißem Alkohol und mit Äther ausgewaschen. Das Plastein wurde zuerst bei gewöhnlicher Temperatur, dann, nach Zerreiben, bei 105 bis 115° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Plastein A).

Lufttrocken wog das Plastein A 3,9 g, d. h. etwa 7,3 Proz. auf die Trockensubstanz der verwendeten Albumosenlösung berechnet. Das erste Filtrat vom Plastein A wurde neutralisiert, aufgekocht, vom gebildeten Niederschlage abfiltriert und mit etwa 3 proz. Papayotinlösung bei durch Soda hergestellter schwach alkalischer Reaktion versetzt. Über Nacht bildete sich nur ein sehr geringer Niederschlag.

2. Darstellung der Koagulose.

Zu 400 ccm der 15,2 proz. Albumosenlösung wurden 5 ccm 10 proz. Sodalösung und 40 ccm etwa 3 proz. Papayotinlösung hinzugesetzt und die Mischung in den Brutschrank bei 40° C gestellt. Sehr bald bildete sich eine Trübung und ein feinflockiger Niederschlag. Nach 24 Stunden wurde die Flüssigkeit aus dem Brutschrank herausgenommen und einen Tag lang bei Zimmer-Temperatur aufbewahrt. Dann wurde der gebildete reichliche Niederschlag abfiltriert und abgepreßt. Er erwies sich als in verdünnter Natronlauge (0,5 bis 1 proz.) nur teilweise löslich. Er löste sich selbst in einer viel konzentrierteren Natronlauge nicht vollständig. Solche stark alkalische Koaguloselösung wurde von mir nicht verarbeitet, weil sie keine Garantie für das Intaktbleiben der Substanz bot.

Das Filtrat von der Koagulose wurde in analoger Weise wie in Versuch 1 mit Lablösung behandelt. Ich erhielt nur etwa 1,5 g lufttrockenes Plastein.

3. Darstellung des Plasteins B.

Wie früher gesagt, überließ ich 2 Liter der Verdauungsflüssigkeit vom kristallisierten Ovalbumin weiterer Verdauung. Nach 18 Tagen wurde die ganz klare Lösung mit Soda neutralisiert, vom sehr spärlichen

---

*) 1,5 g Labpulver Witte einen Tag lang bei gewöhnlicher Temperatur mit 50 ccm Wasser digeriert.

**) Bei dem geringsten Überschuß von Säure löst sich der Niederschlag sofort wieder.

Neutralisationsniederschlage abfiltriert, auf dem kochenden Wasserbade eingeengt und mehr als einen Monat lang unter häufigem Erhitzen aufbewahrt. Darauf wurden zu 200 ccm 16,1 proz. Albumosenlösung 3 ccm 12,5 proz. Salzsäure zugesetzt und die Mischung eine Nacht lang stehen gelassen. Nach Abfiltrieren vom gebildeten, geringen Niederschlage wurde die saure Flüssigkeit mit 20 ccm etwa 3 proz. Lablösung versetzt und in den Brutschrank bei 40° C gestellt. Nach zwei Tagen wurde der gebildete, ziemlich reichliche Niederschlag abfiltriert, abgepreßt und in 200 ccm Wasser zerteilt. Auf Zusatz von 5 ccm 10 proz. Natronlauge löste sich der Niederschlag vollständig. Weitere Bearbeitung der Lösung und des Niederschlags geschah wie beim Plastein A.

Die lufttrockene Substanz (Plastein B) wog 2,35 g, d. h. 7,3 Proz. auf den Trockenrückstand der verwendeten Albumosenlösung berechnet.

4. Zusammensetzung des Plasteins A und B.

Die erhaltenen Plastein-Präparate A und B gaben die Biuretreaktion, Molischs und Adamkiewiczs Probe. Auch die Schwefelbleireaktion fiel sehr scharf aus.

Die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs geschah durch Verbrennung der mit Kupferoxyd gemischten Substanz im Platinschiffchen im offenen Rohr mit Kupferoxyd und vorgelegter reduzierter Kupferspirale im Luft- und Sauerstoffstrome. Der Stickstoff wurde nach Dumas bestimmt. Die Schwefelbestimmung wurde durch Schmelzen der Substanz mit Soda-Salpetergemisch ausgeführt. Die Asche wurde durch Verbrennung der Substanz im Platintiegel bestimmt.

Die Analysen gaben folgendes Resultat:

Plastein A.

1. 0,2476 g gaben 0,5336 g CO_2 = 58,77 Proz. C
   0,2476 g „ 0,1644 g H_2O = 7,37 „ H
2. 0,2046 g „ 0,4418 g CO_2 = 58,88 „ C
   0,2046 g „ 0,1348 g H_2O = 7,32 „ H
3. 0,2384 g „ 0,034426 g N = 14,44 „ N
4. 0,4866 g „ 0,0440 $BaSO_4$ = 1,24 „ S
5. 0,2108 g „ Spuren von Asche.

Plastein B.

6. 0,2444 g gaben 0,5280 g CO_2 = 58,92 Proz. C
   0,2444 g „ 0,1588 g H_2O = 7,22 „ H
7. 0,2736 g „ 0,039165 g N = 14,31 „ N
8. 0,2354 g „ Spuren von Asche.

	Plastein A Proz.	Plastein B Proz.
C	58,77; 58,88 → 58,82	58,92
H	7,37; 7,32 → 7,34	7,22
N	14,44	14,31
S	1,24	—
Asche	Spuren	Spuren

5. Ergebnisse.

Aus den angeführten Tatsachen geht hervor, daß die albumosenartigen Pepsinverdauungsprodukte des kristallisierten Ovalbumins in ähnlicher Weise wie diejenigen der nicht kristallisierten Eiweißkörper zur Plastein- und Koagulosebildung befähigt sind.

Die elementare Zusammensetzung des Plasteins aus dem kristallisierten Ovalbumin zeigt dieselbe Eigentümlichkeit, welche auch für Plasteine von anderer Herkunft gefunden worden ist, d. h. einen hohen Kohlenstoff- und verhältnismäßig niedrigen Stickstoffgehalt.

Die Menge und die Zusammensetzung der gewonnenen Plasteine ist auffallenderweise ganz gleich, ob die Plasteine nach drei- oder achtzehntägiger Pepsinverdauung des kristallisierten Ovalbumins erhalten sind.

Diese Tatsache zeigt, daß die plasteinogene Substanz (vielleicht handelt es sich um ein Gemenge mehrerer solcher Substanzen) schon nach dreitägiger Pepsinverdauung vom Molekül des Ovalbumins abgespalten ist und sich sogar bei weiterer langdauernder Pepsinverdauung quantitativ nicht mehr verändert.

Auf Grund der vorliegenden und meiner früheren Beobachtungen kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Lab- und Papayotinniederschläge, d. h. Plasteine und Koagulosen, chemisch einheitliche Körper sind. In nächster Zeit beabsichtige ich, die kristallinischen Spaltungsprodukte der Plasteine zu untersuchen.

Zum Schluß muß ich noch hinzufügen, daß ich übereinstimmend mit W. Okunew aus Pepsinverdauungsprodukten der Gelatine kein Plastein und keine Koagulose erhalten konnte.

Möglicherweise ist diese Tatsache nicht nur von chemischer, sondern auch von physiologischer Bedeutung. Es liegt die Vermutung nahe, daß im Molekül der echten Eiweißkörper eine besondere eiweißartige plasteinogene Gruppe von hervorragender physiologischer Bedeutung enthalten ist. Die Albuminoide, Gelatine und Keratin [eigentlich die künstlich dargestellten eiweißartigen Spaltungsprodukte des Keratins]*), welche bekanntlich als Nahrungsmittel die echten Eiweißkörper gar nicht ersetzen können, sind der Plasteinbildung (Okunew und ich) nicht fähig.

Schon A. Danilewski, Okunew und Lawrow**) bemühten sich, ein „echtes Pepton" zu erhalten, welches alle Eiweiß-

*) S. Zipkin, Über Einwirkung des Keratins in der Nahrung auf morphologische Prozesse im Organismus. Diss. 1896. St. Petersburg.

**) Die Literatur siehe in meinen früheren einschlägigen Arbeiten.

reaktionen und dazu noch die Plasteinreaktion geben würde. Doch sahen sie in solchem „Pepton“ kein Spaltungsprodukt, sondern nur ein hydriertes Eiweißderivat, was mit den jetzt bekannten Tatsachen nicht im Einklang steht.

II. Verhalten der Plasteinalbumosen zur Magen- und Dünndarmschleimhaut des Hundes.

Um der Aufklärung der physiologischen Bedeutung der Plasteine näher zu treten, unternahm ich eine Reihe von Untersuchungen an Tieren. Die Frage bedarf der Untersuchung in mehrfacher Richtung: a) Fütterungsversuche mit Plasteinen einerseits und mit plasteinfreien Albumosen andererseits; b) Untersuchung des Verhaltens der Plasteine oder besser der Plasteinalbumosen zur Magen- und Dünndarmschleimhaut (und zu anderen Organen) usw. Die hochinteressante Arbeit von K. Gläßner*) aus Hofmeisters Laboratorium, welche zum ersten Mal eine Rückverwandlung der Albumosen in koagulable Stoffe mit Sicherheit beweist, veranlaßte mich, zuerst das Verhalten der Plasteinalbumosen zur Magen- und Dünndarmschleimhaut zu untersuchen. Im folgenden teile ich die Resultate von drei einschlägigen Versuchen mit und behalte mir die weitere Untersuchung in dieser Richtung vor.

Bei der Anstellung der Versuche folgte ich im allgemeinen dem Verfahren von K. Gläßner, G. Embden und F. Knoop**).

Wie erwähnt, benutzte ich für meine Versuche statt des Plasteins selbst die Albumosen, welche ich bei der Pepsinverdauung daraus erhalten hatte. Ein solches Plasteinalbumosengemisch reagiert mit Lab oder Papayotin schon in verdünnter (zwei- und mehrproz.) Lösung sehr gut, d. h. bildet reichliche Niederschläge von den allgemeinen Eigenschaften des Plasteins. Es war von Interesse, zunächst das Verhalten solcher Plasteinalbumosenlösungen zur Magen- und Dünndarmschleimhaut usw. zu untersuchen.

1. Darstellung der Plasteinalbumosen.

100 g Wittepepton wurden in 700 ccm Wasser beim Erwärmen aufgelöst. Die Lösung wurde mit Salzsäure neutralisiert, aufgekocht und nach dem Abkühlen abfiltriert.

Zur erhaltenen Peptonlösung wurden 20 ccm 12,5 proz. Salzsäure und 80 ccm etwa 3 proz. Lablösung hinzugesetzt. Nach zweitägigem Verweilen im Brutschrank wurde die Flüssigkeit von dem sehr voluminösen Niederschlage abfiltriert; die Filtration ging schlecht von statten.

---

*) K. Gläßner, Diese Beiträge 1, 328.

**) S. Embden und Knoop, Diese Beiträge 3, 120.

Der voluminöse, noch viel Flüssigkeit enthaltende Niederschlag wurde durch Zusatz von Natronlauge gelöst, die Lösung mit viel Wasser verdünnt, abfiltriert und mit Salzsäure neutralisiert. Der gebildete voluminöse Niederschlag wurde noch einmal in der angegebenen Weise behandelt. Die schließlich mit Salzsäure neutralisierte alkalische Plasteinlösung wurde auf dem Wasserbade aufgekocht. Der ausgeschiedene höchst voluminöse Niederschlag wurde dabei feinflockig und konnte darauf leicht abfiltriert und mit heißem und kaltem Wasser ausgewaschen werden. Nach dem Auswaschen mit Alkohol wurde das Plastein an der Luft getrocknet, dann gepulvert. Lufttrocken wog es etwa 6,5 g. In solchem Zustande wurde es einen Monat lang aufbewahrt. Darauf wurden zu 6,5 g Plastein 300 ccm 0,5 proz. Salzsäure und ein wenig Pepsinum Grübler zugesetzt und die Mischung in den Brutschrank bei 40° C. gestellt. Über Nacht löste sich das Plastein fast vollständig. Nach viertägiger Verdauung gab die saure Flüssigkeit beim Neutralisieren einen nicht unbedeutenden Niederschlag (nicht verändertes Plastein), der abfiltriert wurde*). Dann wurde die Flüssigkeit aufgekocht und auf dem Wasserbade eingedampft.

Die eingedampfte Plasteinalbumosenlösung reagierte mit Lab und Papayotin sehr rasch und gut. Die für den ersten Magenversuch verwendete Plasteinalbumosenlösung enthielt in 10 ccm 0,06468 g N oder, wenn man den ganzen Stickstoff auf Eiweiß mit 15 Proz. N berechnet, etwa 4,3 Proz. Eiweiß. Ich muß noch hinzufügen, daß meine Plasteinalbumosenlösung, mit dem mehrfachen Volumen einer 1 proz. Lösung von primärem Natriumphosphat (NaH_2PO_4) verdünnt, beim Kochen keine Spur von Niederschlag gab. Auch beim Versetzen einer solchen verdünnten Plasteinalbumosenlösung mit dem halben Volumen saurer gesättigter Zinksulfatlösung entstand kein Niederschlag.

2. Versuche an Hunden.

Versuch 1. Ein kleiner Hund wurde 2½ Stunden nach Fleischfütterung durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Der Magen war mit unverdauten Fleischstücken gefüllt. Er wurde längs der beiden Kurvaturen in zwei Hälften geteilt, sorgfältig vom Inhalt befreit, die Schleimhaut rasch abpräpariert, mit warmer 0,8 proz. Kochsalzlösung gewaschen und zwischen Papier abgepreßt. Darauf wurden die beiden Schleimhauthälften gut zerkleinert, in gewogene Kolben eingebracht und gewogen. Der Schleimhautbrei reagierte schwach sauer. In den einen Kolben wurden 10 ccm der neutralisierten, oben erwähnten Plasteinalbumosenlösung eingebracht und gut umgerührt. Die gut verschlossenen Kolben wurden 3 Stunden bei 40° gehalten, dann wurde der Inhalt mit ¾ Volumen 1 proz. Mononatriumphosphatlösung versetzt und am Rückflußkühler 20 Minuten lang gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit mit der Phosphatlösung auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, gut ge-

*) Ich muß hier bemerken, daß ganz frisch dargestelltes Plastein sich bei Pepsinverdauung rasch löst und verdaut. Schon nach 24 Stunden bekommt man nur einen sehr geringen Neutralisationsniederschlag.

mischt, nach einigen Stunden eine gemessene Menge davon (120 ccm) mit dem halben Volumen gesättigter Zinksulfatlösung, der auf 100 Volumteile 0,4 Volumteile konzentrierter Schwefelsäure hinzugesetzt waren, versetzt, von dieser Flüssigkeit nach 24stündigem Stehen eine bestimmte Menge (30 ccm) abfiltriert und zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl benutzt. Solche Magenschleimhautfiltrate opalisierten immer stark, waren aber ganz durchsichtig. Alle Stickstoffbestimmungen wurden doppelt ausgeführt.

a = Gewicht des Magenschleimhautbreies, der mit 10 ccm Plasteinalbumosenlösung versetzt wurde = 26,9 g;
b = Gesamtvolumen der diesen Schleimhautbrei enthaltenden Flüssigkeit = 440 ccm;
c = Menge der Flüssigkeit, die mit dem halben Volumen gesättigter Zinksulfatlösung versetzt wurde = 120 ccm;
d = Volumen der zu $^1/_3$ mit Zinksulfat gesättigten Flüssigkeit = 180 ccm;
e = Zur N-Bestimmung verwendetes Volumen der letzten Flüssigkeit = 30 ccm;
f = Neutralisierte Menge $\frac{N}{10}$-Schwefelsäure = 7,6 ccm;
g = Für das Gesamtvolumen der Flüssigkeit — 440 — berechnet sich die Menge neutralisierter $\frac{N}{10}$-Säure = $\frac{7,6 \cdot 180 \cdot 440}{30 \cdot 120}$ = 167,2 ccm.

Für die andere Hälfte der Magenschleimhaut waren die entsprechenden Zahlen:

a_1 = 25,5 g
b_1 = 430 ccm
c_1 = 120 ccm
d_1 = 180 ccm
e_1 = 30 ccm
f_1 = 5 ccm
g_1 = 107,5 ccm oder auf 26,9 g der Magenschleimhaut berechnet = 113,4 ccm.

Die 10 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechende Menge $\frac{N}{10}$-Säure ist = 46,2 ccm (0,06468 g N).

Wenn keine Rückverwandlung der Plasteinalbumosen stattgefunden hätte, so hätten wir mindestens 113,4 + 46,2 = 159,6 ccm $\frac{N}{10}$-Säure verbrauchen müssen. Tatsächlich haben wir 167,2 ccm verbraucht, somit 7,6 ccm mehr, d. h. wir haben 10,64 mg Stickstoff mehr gefunden, als man erwarten konnte.

Auf Grund der erhaltenen Resultate muß man schließen, daß unter den angegebenen Versuchsbedingungen keine Rückverwandlung der Plasteinalbumosen im Magenschleimhautbrei stattgefunden hat.

Es ist auffallend, daß die beiden sauren zu $^1/_3$ mit Zinksulfat gesättigten Filtrate bei der vollständigen Sättigung mit Zinksulfat nur Spuren von Trübung zeigten, die Biuretreaktion aber sehr ausgesprochen gaben. Daraus muß man schließen, daß die beiden

Filtrate nur Spuren von Albumosen enthielten und die hinzugesetzten Plasteinalbumosen sich in Peptone event. in weitere Spaltungsprodukte verwandelt hatten. Zum Schluß sei bemerkt, daß sich die frisch durch Lab in Plasteinalbumosenlösung gebildeten Niederschläge beim Kochen mit viel NaH_2PO_4-Lösung nicht lösen.

Versuch 2. Ein mittelgroßer Hund wurde 6 Stunden nach Fleischfütterung durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Der Magen war mit unverdauten Fleischmassen halb gefüllt. Die weitere Bearbeitung war dieselbe, wie im Versuch 1, nur wurden zu der einen Hälfte der Magenschleimhaut 20 ccm Plasteinalbumosenlösung, zur anderen 20 ccm 0,8 proz. NaCl-Lösung hinzugesetzt. Der Magenschleimhautbrei war neutral oder nur eben sauer.

Ergebnisse:

a = 35,35 g
b = 430 ccm
c = 120 ccm
d = 180 ccm
e = 30 ccm
f = 11,1 ccm
g = 238,65 ccm.

Für die andere Hälfte der Magenschleimhaut sind die entsprechenden Zahlen:

a_1 = 34,9 g
b_1 = 440 ccm
c_1 = 120 ccm
d_1 = 180 ccm
e_1 = 30 ccm
f_1 = 9,55 ccm
g_1 = 210,1 ccm oder, auf 35,35 g berechnet = 212,8 ccm.

Die den 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechende Menge $\frac{N}{10}$-Säure = 99,8 ccm.

Wenn keine Rückverwandlung der Plasteinalbumosen stattgefunden hatte, so war für die erste Schleimhauthälfte verlangt: $g = 212{,}8 + 99{,}8 = 312{,}6$ ccm. Tatsächlich wurden gefunden nur 238,65 ccm. Es fehlen also 73,95 ccm $\frac{N}{10}$-Säure oder 0,10353 g Stickstoff = 74,1 Proz. der ganzen mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffmenge.

Bei der Sättigung der Filtrate d und d_1 mit Zinksulfat bildete sich im Gegensatz zum ersten Versuch ein nicht unbedeutender Albumosenniederschlag.

Versuch 3. Dem in Versuch 2 verwendeten Hund wurde sofort nach dem Tode ein Dünndarmstück (Jejunum) entnommen, längs des Mesenterialansatzes eröffnet, vom Inhalt auf das gründlichste (Auspressen zwischen den Fingern und Waschen) gereinigt. Zuletzt wurde das gereinigte Darmstück mit der Schere der Länge nach in zwei möglichst symmetrische

Teile zerschnitten. Die übrige Bearbeitung geschah wie im Versuch 2. Das Verweilen im Brutschrank dauerte nur 2 Stunden.

Ergebnisse:

a = 39,92 g
b = 400 ccm
c = 120 ccm
d = 180 ccm
e = 30 ccm
f = 11,5 ccm
g = 230 ccm.

Für die andere Hälfte des Dünndarmstückes sind die entsprechenden Zahlen:

a_1 = 38,68 g
b_1 = 390 ccm
c_1 = 120 ccm
d_1 = 180 ccm
e_1 = 30 ccm
f_1 = 8,15 ccm
g_1 = 158,92 ccm, oder auf 39,92 g berechnet = 164 ccm.

Die den 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechende Menge $\frac{N}{10}$-Säure = 99,8 ccm.

Wenn keine Rückverwandlung der Plasteinalbumosen stattgefunden hatte, so mußte man für die erste Dünndarmhälfte $g = 164 + 99{,}8 = 263{,}8$ ccm $\frac{N}{10}$-Säure finden. Tatsächlich haben wir nur 230 ccm erhalten. Es fehlen also 33,8 ccm $\frac{N}{10}$-Säure, d. h. 0,04732 g Stickstoff oder 33,9 Proz. des mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Bei der Sättigung der Filtrate d und d_1 mit Zinksulfat bildeten sich feinflockige Albumosenniederschläge (mehr im Filtrat d).

3. Schluß.

Wegen der geringen Zahl der Versuche möchte ich aus dem Mitgeteilten keine endgültigen Schlüsse ziehen. Es bedarf noch weiterer Untersuchungen und Kontrollversuche in dieser Richtung. Doch kann man wohl schon jetzt auf Grund meiner Magenversuche von einer Umwandlung der Plasteinalbumosen in koagulable Stoffe durch die Magenschleimhaut mit einiger Wahrscheinlichkeit reden. Bemerkenswert ist die auffallende Übereinstimmung der Resultate meiner Magenversuche mit denjenigen von K. Gläßner. Dieser Autor konnte keine Rückverwandlung der in der Magenschleimhaut enthaltenen Albumosen konstatieren, wenn er den Hund im Beginn der Verdauung (3 Stunden nach Fleischfütterung) tötete und für den Versuch benutzte; dagegen war die Rückverwandlung der Albumosen 4½ bis 8 Stunden nach der Fütterung sehr ausgesprochen.

Ganz dieselbe Erscheinung konnte auch ich in meinen Magenversuchen konstatieren. Im Hinblick auf diese auffallende Übereinstimmung wäre es höchst interessant, die in der Magenschleimhaut während der Verdauung vorfindlichen Albumosen näher zu untersuchen, event. ihre ausgesprochen plasteinogene Eigenschaft festzustellen. Die weitere Bearbeitung der hier angedeuteten Fragen behalte ich mir vor.

Die beschriebenen Tierversuche wurden mit Hilfe von Dr. A. Nürnberg, dem ich meinen besten Dank ausspreche, ausgeführt.

XXXVIII.

Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Beziehungen der schwefelhaltigen Eiweißabkömmlinge.

Dritte Mitteilung.

Über die Konstitution der Merkaptursäuren.

Von **E. Friedmann.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Baumann und Preuße*) haben für die Merkaptursäuren folgende Formel aufgestellt:

$$
\begin{array}{c}
CH_3 \\
| \\
CH_3.CO.NH-C-SC_6H_4X \\
| \\
COOH
\end{array}
$$

Nach dieser Formel wären diese Substanzen Derivate eines *α*-Cysteins**):

$$
\begin{array}{c}
CH_3 \\
| \\
NH_2-C-SH \\
| \\
COOH
\end{array}
$$

Die Tatsachen, auf Grund deren Baumann und Preuße die Merkaptursäuren als *αα*-substituierte Propionsäurederivate ansprachen, sind einmal in dem Auftreten von Gärungsmilchsäure bei der Reduktion dieser Säuren mit Natriumamalgam in der Kälte, dann in der leichten Bildung von Brenztraubensäure bei der Alkalispaltung zu suchen***). Das Vorhandensein eines Acetylrestes ergab sich aus der Bildung von Essigsäure bei der Einwirkung von Säuren auf die Merkaptursäuren†), die Bindung des Acetylrestes an eine

*) Baumann und Preuße, Zeitschr. f. physiol. Chemie 5, 309.

**) E. Friedmann, Diese Beiträge 3, 1.

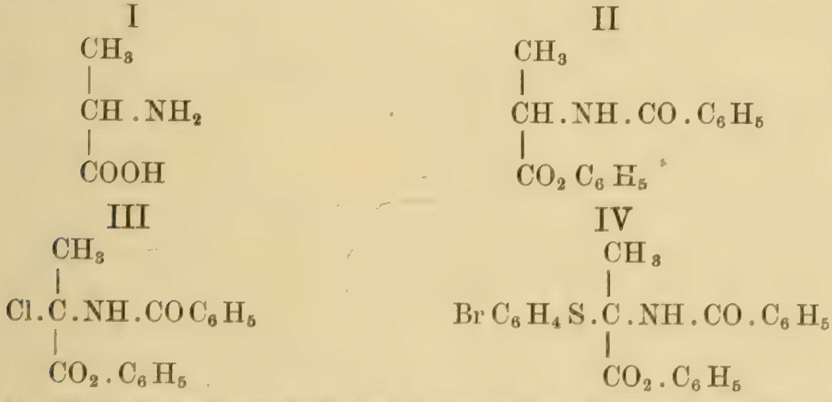
***) Baumann und Preuße, loc. cit. S. 319 u. 326.

†) Baumann und Preuße, loc. cit. S. 315.

Aminogruppe durch die Zurückbildung von Merkaptursäure*) bei Einwirkung von in Benzol gelöstem Essigsäureanhydrid auf den bei der Säurespaltung erhältlichen, von Baumann und Preuße Bromphenylcystein genannten Körper. Die Bindung des Bromphenylrestes an den Schwefel der Merkaptursäuren**) wurde durch das Auftreten von Bromphenylmerkaptan bei der Alkalispaltung bewiesen.

Auch die von König***) in Baumanns Laboratorium dargestellten Oxydationsprodukte der Merkaptursäuren zeigten in ihrer leichten Zersetzlichkeit durch Alkali ein Verhalten, das gut zu der von Baumann vertretenen Anschauung über die Konstitution der Merkaptursäuren paßte.

Baumann erschien die α-Stellung sowohl der Aminogruppe, wie des Bromphenylmerkaptanrestes so sicher begründet, daß er die Synthese der Merkaptursäuren in Angriff nahm. Weiß†), der diese Versuche ausführte, ging vom Alanin (I) aus, dessen Benzoylphenylester (II) er der Einwirkung von Phosphorpentachlorid unterwarf. Das so erhaltene $\alpha\alpha$-substituierte Produkt (III) wurde mit Bromphenylmerkaptan in Reaktion gebracht, der resultierende Körper (IV) sollte den Phenylester des Benzoylbromphenylcysteins darstellen:



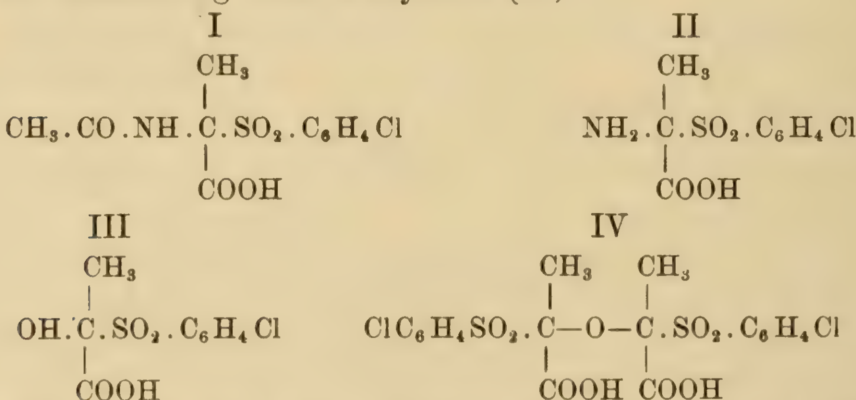
Auffallend war, und Weiß betont dies besonders, daß es nicht gelang, das aus diesem Ester dargestellte Amid zur Säure zu verseifen, vielmehr trat bei dahin zielenden Eingriffen völlige Zersetzung ein.

Jedoch gelang es S. Fränkel††) auf Veranlassung von Baumann, von den Merkaptursäuren ausgehend zu Substanzen zu

*) Baumann, Berl. Ber. 18, 266.
**) Baumann und Preuße, loc. cit. S. 319.
***) König, Zeitschr. f. physiol. Chemie 16, 547.
†) Weiß, Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 407.
††) S. Fränkel, Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 435.

kommen, deren Verhalten dem der von Weiß dargestellten synthetischen Produkte analog war. (Verglichen wurden der oben erwähnte Benzoylphenylester und sein Amid.) Die beobachteten Abweichungen im Schmelzpunkt und in der Kristallform der betreffenden Körper erklärt S. Fränkel daraus, daß es sich bei den Derivaten der Merkaptursäuren um optisch aktive, bei den vom Alanin aus synthetisch erhaltenen Produkten um Racemkörper handelte. Ein Versuch jedoch, von racemisierten Merkaptursäuren Vergleichspräparate zu gewinnen, wurde nicht ausgeführt. Es können daher die auf diese Synthese der Merkaptursäuren sich stützenden Argumente nicht einwandsfreie Beweiskraft beanspruchen.

Unter dem reichhaltigen Tatsachenmaterial, mit dem Baumann seine Auffassung über die Konstitution der Merkaptursäuren stützen konnte, findet sich einzig eine Beobachtung von König*), die aus dem Rahmen des sich auf Grund der übrigen Erfahrungen Baumanns über die Konstitution der Merkaptursäuren ergebenden Bildes herausfällt. König erhielt nämlich unter den Oxydationsprodukten der Merkaptursäuren eine Substanz (I), die nach Abspaltung des Acetylrestes (II) und Ersatz der Aminogruppe durch die Hydroxylgruppe (III) unter der Einwirkung von Alkali nicht, wie erwartet, Brenztraubensäure und Chlorbenzolsulfinsäure lieferte. Die $\alpha\alpha$-Substitution erwies sich in diesem Falle als beständig, und das einzige Resultat der Alkalibehandlung war die Entstehung eines Anhydrids (IV):



König vergleicht diese Anhydridbildung mit dem Verhalten der Thiophenyloxypropionsäure, die von Baumann**) bei der Einwirkung von Phenylmerkaptan auf Brenztraubensäure erhalten war, und die ebenfalls unter bestimmten Bedingungen zur Anhydridbildung in dem oben gekennzeichneten Sinne befähigt ist.

---

*) H. König, Zeitschr. f. physiol. Chemie **16**, 525.

) Baumann, Berl. Ber. **18, 266.

$$C_6H_5S.\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}.OH \longrightarrow C_6H_5S.\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}-O-\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}.SC_6H_5$$

Bedenkt man aber, daß die Thiophenyloxypropionsäure bereits durch Wasser in Brenztraubensäure und Phenylmerkaptan zerlegt wird, während die Chlorphenylsulfopropionsäure Königs gegen Wasser beständig ist, ferner daß die Anhydridbildung hier durch Phosphoroxychlorid erzielt wird, während sie dort eine Folge der Alkalieinwirkung ist, so ergibt sich, daß die Grundlagen zur Konstruktion dieser Analogie doch etwas zweifelhaft sind.

Scheinen so Gründe chemischer Natur dahin zu drängen, die Frage nach der Konstitution der Merkaptursäuren von neuem aufzuwerfen, so kommen Erwägungen physiologischer Natur hinzu, die es notwendig erscheinen lassen, diese Frage zur Entscheidung zu bringen. In einer früheren Mitteilung*) habe ich zeigen können, daß ein Zusammenhang zwischen den nach der Baumannschen Formel konstituierten Merkaptursäuren (I) und dem Eiweißcystein (II) auszuschließen ist, da erstere Derivate eines α-Cysteins sind, letzteres aber ein β-Cystein ist.

$$\overset{\text{I}}{CH_3.CO.NH.\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}.SC_6H_4X} \qquad \overset{\text{II}}{\overset{\displaystyle CH_2.SH}{\underset{\displaystyle COOH}{\overset{|}{\underset{|}{CH.NH_2}}}}} \qquad \overset{\text{III}}{\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH.}{\overset{|}{\underset{|}{CH.SH}}}}}$$

Da ich ferner α-Thiomilchsäure (III)**) als Spaltungsprodukt der Keratinsubstanzen und des Serumalbumins nachgewiesen habe, so war die Möglichkeit einer synthetischen Bildung der Merkaptursäuren von dieser α-Thiomilchsäure aus nicht ganz von der Hand zu weisen. Für die tierexperimentelle Bearbeitung dieser Frage ist aber die Sicherstellung der Konstitution der Merkaptursäuren eine kaum zu umgehende Vorbedingung.

Bei der Konstitutionsbestimmung der Merkaptursäuren kann es sich, wie aus dem anfangs Gesagten ersichtlich ist, nur darum handeln, ob in dem ihnen zugrunde liegenden Propionsäurekern die β-Stellung besetzt ist oder nicht, da eine Substition in α-Stellung sowohl aus der Bildung von Brenztraubensäure bei der Alkalispaltung, wie aus dem Auftreten von Gärungsmilchsäure bei der Reduktion mit Sicherheit abzuleiten ist.

---

*) E. Friedmann, Diese Beiträge **3**, 1.

) E. Friedmann, Diese Beiträge **3, 184.

Demnach kommen für die Merkaptursäuren folgende Formeln in Betracht — ich wähle der Bequemlichkeit wegen die Aminobromphenylthiopropionsäure (Baumanns Bromphenylcystein):

$$\begin{array}{ccc} \text{I} & \text{II} & \text{III} \\ CH_3 & CH_2 . SC_6H_4Br & CH_2 . NH_2 \\ | & | & | \\ NH_2 . C . SC_6H_4Br & CH . NH_2 & CH . SC_6H_4Br \\ | & | & | \\ COOH & COOH & COOH. \end{array}$$

Formel I entspricht der Baumannschen Auffassung der Konstitution der Merkaptursäuren. Nach Formel II wären sie Abkömmlinge des Eiweißcysteins, nach Formel III wären sie Derivate eines α-Thio-β-aminocysteins.

Das zur Konstitutionsbestimmung notwendige Ausgangsmaterial wurde aus nach Brombenzolfütterung erhaltenem Hundeharn dargestellt.

I.

Darstellung des Ausgangsmaterials*).

Die Applikation des Brombenzols geschah in der Art, daß mittelgroßen kräftigen Hunden bei reichlicher Fleischfütterung je 5 g Brombenzol in Gelatinekapseln täglich verfüttert wurden. Nach dem fünften oder sechsten Tage wurde die Fütterung einen Tag ausgesetzt.

Zur Darstellung der Merkaptursäuren aus dem so erhaltenen Hundeharn wurde, wie folgt, verfahren.

Der Harn wird mit $^1/_{10}$ Volumen konz. Salzsäure (Spez.-Gew. 1,19) versetzt und 10 Tage stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird vom kristallinischen Bodensatz, der zum größten Teil aus Merkaptursäure besteht, abgegossen. Die Kristalle werden im Becherglase durch wiederholtes Aufrühren mit Wasser gereinigt und das Dekantieren fortgesetzt, bis die über den Kristallen stehende Flüssigkeit nur noch schwach gelb gefärbt ist, darauf im selben Gefäße mit 10proz. Ammoniak in der Wärme zur Lösung gebracht, und die braune, heiße, ammoniakalische Lösung durch ein Tierkohlenfilter hindurchgesaugt. Nach dreimaligem Passieren des Tierkohlenfilters in der Wärme ist die ammoniakalische Flüssigkeit nur noch schwach gelb gefärbt. Sie wird zur Kristallisation eingeengt. Das beim Erkalten auskristallisierende Ammoniumsalz wird abgesaugt und scharf von der Mutterlauge abgepreßt. Es ist in der Regel nur noch wenig gefärbt. Zur Abscheidung der freien Merkaptursäure wird das Ammoniumsalz in die 20fache Menge heissen Wassers eingetragen. Nach erfolgter Lösung wird in der Wärme mit verdünnter

*) Das zu dieser Untersuchung notwendige Ausgangsmaterial habe ich mir in der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Berlin dargestellt. Herrn Prof. Thierfelder bin ich für die Freundlichkeit, mit der er mir erlaubte, in seinem Laboratorium als Gast zu arbeiten, zu großem Danke verpflichtet.

Schwefelsäure angesäuert. Der größte Teil der Bromphenylmerkaptursäure fällt sofort aus, der Rest nach zwölfstündigem Stehen im Eisschrank.

Dieses Verfahren entspricht im wesentlichen den von Baumann und Schmitz*) bei der Darstellung der Jodphenylmerkaptursäure gemachten Angaben. Beim Arbeiten nach der Vorschrift, die Baumann und Preuße zur Isolierung der Merkaptursäuren angegeben haben, gelang es mir nicht, Merkaptursäure in genügender Menge zu erhalten, auch machte sich bei diesem Verfahren die Anwesenheit von Kynurensäure stets unangenehm bemerkbar.

Die Ausbeute an Merkaptursäure entsprach den von Baumann und Preuße gemachten Erfahrungen. Es konnten nach Verfütterung von 100 g Brombenzol 25 bis 30 g Bromphenylmerkaptursäure isoliert werden.

Aminobromphenylthiopropionsäure (Baumanns Bromphenylcystein).

Bromphenylmerkaptursäure wird den Angaben von Baumann und Preuße entsprechend mit der dreißigfachen Menge verdünnter Schwefelsäure (1 Tl. Schwefelsäure, 4 Tle. Wasser) $^3/_4$ Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dieser Zeit ist völlige Lösung eingetreten. Die schwach gefärbte Flüssigkeit wird in der Wärme mit 10proz. Ammoniak nahezu neutralisiert und mit Ammoniumkarbonat schwach übersättigt. (Ein Verdünnen mit dem mehrfachen Volumen Wasser, wie es Baumann und Preuße vorschreiben, habe ich unterlassen, weil ich hierdurch weder ein reineres Produkt noch eine größere Ausbeute erzielte.) Die ausgeschiedene Aminobromphenylthiopropionsäure schwimmt zum größten Teil als schlammige Masse an der Oberfläche der Flüssigkeit, sie wird nach dem völligen Erkalten abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Die Ausbeute ist quantitativ.

II.

Über die Stellung des Bromphenylmerkaptanrestes in der Bromphenylmerkaptursäure.

Zur Bestimmung der Stellung des Bromphenylmerkaptanrestes in der Bromphenylmerkaptursäure bin ich denselben Weg gegangen, den ich bei der Untersuchung der dem Cystein zugrunde liegenden Thiomilchsäure mit Erfolg beschritten habe. Ich habe versucht nach der Reaktion von Jochem**) durch Einwirkung von Natriumnitrit auf Aminobromphenylthiopropionsäure in konzentriert salzsaurer Lösung die Aminogruppe durch Chlor zu ersetzen, um von der so erhaltenen Verbindung durch Reduktion zu der den Merkaptursäuren zugrunde liegenden Bromphenylthio-

*) E. Baumann und P. Schmitz, Zeitschr. f. physiol. Chemie **20**, 586.

) Jochem, Zeitschr. f. physiol. Chemie **31, 119.

milchsäure zu gelangen. Denn die Betrachtung der drei für die Merkaptursäuren möglichen Formeln ergibt, daß einem nach der Formel I oder III gebauten Bromphenylcystein eine Bromphenyl-α-thiomilchsäure, einem nach der Formel II sich ableitenden Körper dagegen eine Bromphenyl-β-thiomilchsäure zugrunde liegen muß.

A. Einwirkung von Natriumnitrit auf Aminobromphenylthiopropionsäure in konzentriert salzsaurer Lösung.

1. Versuch.

5 g Aminobromphenylthiopropionsäure werden in 200 ccm konzentrierter Salzsäure (Spez. Gew. 1,19) suspendiert und durch Rühren mittelst Turbine in feiner Suspension gehalten. In dieses Gemisch wird eine Lösung von 15 g Natriumnitrit in 30 ccm Wasser innerhalb zwei Stunden eingeträufelt. Die Reaktion tritt langsam ein und nimmt allmählich an Intensität zu. Nach beendetem Zusatz des Nitrits schwimmt eine ölige, breiige Masse an der Oberfläche der Flüssigkeit, eine weiße kristallinische Masse befindet sich auf dem Boden des Gefäßes, die Flüssigkeit selbst ist hellgelb gefärbt. Das Reaktionsgemisch wird 12 Stunden sich selbst überlassen, darauf mit Äther überschichtet und durch energisches Rühren die auf der Oberfläche schwimmende Schicht in Lösung gebracht. Nach erfolgter Lösung wird abgesaugt, die auf dem Filter zurückbleibenden, schneeweißen Kristalle werden einige Male mit Äther nachgewaschen. Die Menge der zurückbleibenden Kristalle beträgt 11,4 g. Sie bestehen zum größten Teil aus Kochsalz und wenig unveränderter Aminobromphenylthiopropionsäure.

Das wässerige, ätherische Filtrat dieser Kristalle wird im Scheidetrichter getrennt, und die so erhaltene wässerig salzsaure Lösung viermal mit Äther ausgeschüttelt. Sowohl der ätherische Auszug, wie die wässerige, salzsaure Lösung wurden untersucht.

Es war zu vermuten, daß die erwartete Chlorbromphenylthiopropionsäure im ätherischen Auszug vorhanden wäre.

Die ätherischen Extrakte werden vom Äther befreit. Beim Abdestillieren des Äthers entwickeln sich zum Schluß der Operation nitröse Dämpfe. Der Rückstand wird in wenig Äther gelöst und die ätherische Lösung im Vakuum über Schwefelsäure eingedunstet. Die Menge des Rückstandes beträgt 3 g. Nach dreitägigem Stehen ist ein Teil desselben kristallinisch erstarrt. Die Kristalle bleiben beim Übergießen des Rückstandes mit wenig Äther zurück, ihre Menge beträgt 1,3 g. Die von diesen Kristallen abgegossene ätherische Flüssigkeit lieferte 1,7 g eines öligen Körpers, der auch nach tagelangem Stehen keine Neigung zum Kristallisieren zeigte.

Es waren also im ätherischen Auszuge zum mindesten zwei Körper vorhanden, eine kristallinische und eine ölige Substanz.

Dem ausgeschiedenen kristallinischen Körper haftet der eigentümliche, faulige Geruch des Bromphenylmerkaptans an. Der Schmelzpunkt liegt bei 130 bis 131°. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Äther, in dem die Kristalle jetzt schwer löslich sind, steigt der Schmelzpunkt auf 147 bis 148°, nach zweimaligem auf 149° und bleibt bei weiterem Umkristalli-

sieren konstant bei 149°. Es wurde eine Elementaranalyse und eine Halogenbestimmung dieses Körpers ausgeführt.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1818 g Substanz gaben 0,2351 g CO_2, entspr. 35,27 Proz. C
und 0,0465 „ H_2O, „ 2,86 „ H
0,1820 g Substanz gaben 0,1114 g AgBr, „ 26,05 „ Br.

Die Zahlen ergeben, daß die vorliegende Substanz eine Oxybromphenylsulfopropionsäure ist.

Ber. f. $C_9H_9O_5SBr$.		Gef.
C	34,94 Proz.	35,27 Proz.
H	2,93 „	2,86 „
Br	25,86 „	26,05 „

Die Substanz ist in kaltem Äther schwer löslich, ebenso in kaltem Wasser. Dagegen löst sie sich in beiden Lösungsmitteln in der Wärme, ohne beim Erkalten wieder auszufallen. Die wässerige Lösung setzt aber auf Zusatz von Säuren sofort einen kristallinischen Niederschlag ab, der aus unveränderter Oxybromphenylsulfopropionsäure vom Schmelzpunkt 149° besteht. Beim langsamen Auskristallisieren aus heißem Wasser scheidet sich die Substanz in schönen, durchsichtigen Nadeldrusen aus, die kristallwasserhaltig sind, beim Stehen an der Luft opak werden und verwittern. Der Körper gibt mit konzentrierter Schwefelsäure keine charakteristische Farbenreaktion und ist in reinem Zustand geruchlos.

Die ätherische Mutterlauge dieser Oxybromphenylsulfopropionsäure, die nach Abdestillieren des Äthers 1,7 g eines öligen Körpers geliefert hatte, enthielt die gesuchte Chlorbromphenylthiopropionsäure.

Ihre Reinigung geschah in der Art, daß sie mit Äther aufgenommen und die ihr anhängende Salzsäure durch wiederholtes Waschen mit Wasser entfernt wurde. Sie wurde nach Abdestillieren des Äthers als gelbes Öl erhalten, das beim Behandeln mit Alkali Salzsäure und Bromphenylmerkaptan abspaltete. Letzteres wurde als Disulfid vom Schmelzpunkt 81° identifiziert.

Neben den beiden im Ätherauszuge vorhandenen Körpern, der Oxybromphenylsulfopropionsäure und der Chlorbromphenylthiopropionsäure, war bei der Einwirkung von Nitrit auf Aminobromphenylthiopropionsäure die Entstehung von noch zwei anderen Körpern nachzuweisen, die in der vom ätherischen Auszug getrennten, wässerig salzsauren Flüssigkeit vorhanden waren und wie folgt, isoliert wurden.

Nach längerem Stehen im Eisschrank scheiden sich aus der wässerig salzsauren Lösung schöne, gut ausgebildete Nadeln aus, die leicht braun

gefärbt sind. Sie werden abgesaugt. Ihre Menge beträgt 0,6 g. Beim Einengen des Filtrats dieser Kristallisation wird eine zweite kristallinische Ausscheidung von 0,5 g erhalten. Die beiden Kristallisationen werden getrennt in der gleichen Weise verarbeitet. Beide werden in der Wärme in möglichst wenig absolutem Alkohol gelöst. Beim Stehen in der Kälte scheiden sich schöne, blättrige Kristalle aus. Dieselben werden abgesaugt. Sie sind, einmal aus der alkoholischen Lösung isoliert, in Alkohol unlöslich. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 192°. In konzentrierter Schwefelsäure gelöst und erwärmt, färben sie die Lösung blaugrün, eine Reaktion, die das Vorhandensein eines Bromphenylmerkaptanrestes anzeigt. Mit Natronkalk erhitzt, geben sie Ammoniak ab. Da nur 0,08 g analysenreines Produkt erhalten werden konnte, mußte von einer Analyse Abstand genommen werden. Jedoch machten es die angegebenen Reaktionen wahrscheinlich, daß der vorliegende Körper eine Aminobromphenylthiopropionsäure ist. Es soll später noch einmal auf diesen Körper eingegangen werden.

Neben dieser Aminobromphenylthiopropionsäure vom Schmelzpunkt 192° war eine Aminobromphenylsulfopropionsäure nachzuweisen.

Zu ihrer Isolierung wird das alkoholische Filtrat des oben besprochenen Körpers stark eingeengt und in der Kälte mit dem mehrfachen Volumen Essigäther versetzt. Es beginnt sofort eine Kristallisation von kleinen weißen Nadeln. Nach beendeter Ausscheidung werden dieselben abgesaugt. Ihre Menge beträgt 0,6 g. Von neuem in Alkohol gelöst und mit dem mehrfachen Volumen Essigäther versetzt, scheiden sie sich nicht sogleich wieder aus, wohl aber beginnt sofort eine reichliche Kristallisation bei gelindem Erwärmen dieser essigäther-alkoholischen Lösung auf dem Wasserbade.

Die Analyse der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz gab die für Aminobromphenylsulfopropionsäure verlangten Zahlen.

0,1306 g Substanz gaben 0,1675 g CO_2, entspr. 34,98 Proz. C
und 0,0449 „ H_2O, entspr. 3,85 Proz. H.

0,1284 g Substanz gaben 5,89 ccm N (749,5 mm, 23,1°).

	Ber. f. $C_9H_{10}O_4NBrS$	Gef.
C	35,05 Proz.	34,98 Proz.
H	3,27 „	3,85 „
N	4,60 „	5,00 „

Die Substanz schmilzt bei 196° unter Zersetzung. Mit Natronkalk geglüht, entwickelt sie Ammoniak. Mit konzentrierter Schwefelsäure gibt sie nur eine Braunfärbung.

Eine Aminobromphenylsulfopropionsäure vom Schmelzpunkt 163 bis 164° ist bereits von König in seiner Arbeit über die Oxydationsprodukte der Merkaptursäuren beschrieben worden. Diese gab ebenso wie die von mir erhaltene Säure mit konzentrierter Schwefelsäure Braunfärbung. Die Differenz im Schmelzpunkt erklärt sich vielleicht daraus, daß König eine optisch aktive Substanz in den Händen gehabt hat, ich dagegen vermutlich eine optisch inaktive. Allerdings ist die Größe der Differenz auffällig.

Es konnten also unter den Produkten der Einwirkung von Natriumnitrit auf Aminobromphenylthiopropionsäure unter den geschilderten Bedingungen neben unveränderter Aminobromphenylthiopropionsäure vom Schmelzpunkt 181 bis 182°, Oxybromphenylsulfopropionsäure, Chlorbromphenylthiopropionsäure, eine Aminobromphenylthiopropionsäure vom Schmelzpunkt 192° und eine Aminobromphenylsulfopropionsäure vom Schmelzpunkt 196° nachgewiesen werden.

Ob die beim Abdestillieren des Äthers sich entwickelnden nitrösen Dämpfe der Ausdruck einer nachweislichen, nachträglichen Oxydation waren oder nicht, so daß an Stelle oder neben der erhaltenen Oxybromphenylsulfopropionsäure auch die entsprechende Oxybromphenylthiopropionsäure bei der Reaktion entstanden wäre, habe ich nicht feststellen können. Ich habe nach dieser Säure gesucht, aber vergeblich. Sie wäre interessant, weil sie, die Richtigkeit der Baumannschen Formel vorausgesetzt, mit der von Baumann durch Einwirkung von Bromphenylmerkaptan auf Brenztraubensäure erhaltenen Säure identisch sein müßte.

Der eben geschilderte Versuch zeigt neben der Vielseitigkeit des Reaktionsverlaufes, wie spärlich die Ausbeute an der gesuchten Chlorbromphenylthiopropionsäure unter den beschriebenen Bedingungen ist. Ich habe daher, um die zur Reduktion nötigen Mengen zu erhalten, die Bedingungen der Einwirkung des Nitrits ändern müssen und bin nach einigen vergeblichen Versuchen auf folgendem Wege zum Ziele gelangt.

2. Versuch.

5 g Aminobromphenylthiopropionsäure vom Schmelzpunkt 181° werden in der fünffachen Menge rauchender Salzsäure suspendiert und unter Eiskühlung bei leichtem Schwenken des Reaktionsgefäßes mit einer konzentrierten Lösung von 5 g Natriumnitrit langsam versetzt. Nach Zusatz von etwa 2,5 g Nitrit wird die Operation unterbrochen, das Gefäß aus dem Eis herausgenommen, bis die begonnene Reaktion bei Zimmertemperatur beendet ist. Nachdem dies geschehen ist, wird mit dem Nitritzusatz fortgefahren, zu Anfang unter Eiskühlung bis zu dem Punkte, wo die teigige Konsistenz des Reaktionsproduktes augenfällig wird. Jetzt wird bei Zimmertemperatur weiter diazotiert. Da nach Zusatz von 5 g Nitrit noch immer nicht unbeträchtliche Mengen des Ausgangsmaterials unverbraucht sind, wird noch ein weiteres g Nitrit bei Zimmertemperatur hinzugesetzt. Nachdem dies geschehen ist, schwimmt das Reaktionsprodukt als braunes Öl auf der Oberfläche der salzsauren Lösung. Zur Verjagung der Stickoxyde wird etwa eine Stunde Luft durch das Reaktionsgemenge geleitet, darauf das Öl mit Äther aufgenommen, die ätherische Lösung durch Waschen mit Wasser von anhängender Salzsäure befreit und der Äther abdestilliert. Die Ausbeute an ätherlöslichem Produkt beträgt 4 g. Oxybromphenylsulfopropionsäure war in diesem Falle nicht gebildet worden.

Nachdem dieser Versuch ausreichende Mengen Chlorbromphenylthiopropionsäure geliefert hatte, war zu hoffen, daß bei der

Reduktion etwa entstehende Bromphenylthiopropionsäure auch identifiziert werden könnte.

B. Reduktion der Chlorbromphenylthiopropionsäure.

1. Versuch.

2 g Chlorbromphenylthiopropionsäure werden mit 60 ccm Salzsäure (1 Tl. Wasser, 5 Tle. konzentrierter Salzsäure) übergossen und nach Zusatz von granuliertem Zinn bei Wasserbadtemperatur reduziert. Dabei wird auffallend viel Bromphenylmerkaptan abgespalten. Das der Reduktion unterworfene Öl zeigt keine wahrnehmbare Veränderung. Nach $1^1/_2$stündiger Reduktion wird die heiße Flüssigkeit vom ungelösten Zinn abgegossen und das zurückbleibende Zinn einige Male mit Wasser abgespült. Die abgegossene Flüssigkeit, aus der sich ein schweres, rasch erstarrendes Öl zu Boden senkt, trübt sich beim Erkalten und scheidet nach einigem Stehen in der Kälte schön ausgebildete Kristalle ab.

Die Reinigung dieses Reduktionsprodukts, das die gesuchte Bromphenylthiopropionsäure enthalten sollte, war wegen des schwer zu beseitigenden Bromphenylmerkaptans mit großen Verlusten verbunden.

Das kristallinisch erstarrte Öl, wie die ausgeschiedenen Kristalle werden abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen, in Soda gelöst und die trübe Lösung mit Salzsäure angesäuert. Es entsteht sofort eine dicke milchige Trübung, die rasch ein zum größten Teil erstarrendes, gelbes Öl absetzt neben spärlichen, weißen, blättrigen Kristallen. Nachdem die Flüssigkeit völlig klar geworden ist, wird abgesaugt und der Rückstand von neuem in Soda in der Wärme gelöst, die trübe Sodalösung abgekühlt und nach 24stündigem Stehen das ausgeschiedene Dibromphenyldisulfid abfiltriert. Die Filtration muß durch ein Barytfilter geschehen, da das Disulfid große Neigung hat, durch das Filter hindurchzugehen, und wird wiederholt, bis ein klares Filtrat erhalten wird. Da dasselbe gelb gefärbt ist, wird es in der Kälte mit Tierkohle andauernd geschüttelt. Nach Entfernung der Tierkohle wird angesäuert, aber auch diesmal haftet dem ausgeschiedenen Produkte eine ölige Verunreinigung an. Erst als gefunden wurde, daß die Kristalle unter Zurücklassung eines Teiles der öligen Beimengung in Petroläther löslich waren, gelang es, zu einem sauberen Körper zu kommen. Beim Eindunsten der Petrolätherlösung kristallisiert die Substanz in zu Drusen vereinigten Blättchen aus, deren Schmelzpunkt bei 112 bis 113° liegt. Von neuem in Soda gelöst und mit Salzsäure ausgefällt, steigt der Schmelzpunkt auf 115 bis 116° und bleibt jetzt bei erneutem Umfällen konstant.

Von den Eigenschaften dieses Körpers ist sein Verhalten gegen konzentrierte Schwefelsäure besonders hervorzuheben. Übergießt man nämlich die trockene Substanz mit konzentrierter Schwefelsäure und erwärmt gelinde, so färbt sich sehr bald die Schwefelsäure schön kirschrot, bei weiterem Erwärmen wird die Farbe purpurrot, um bei starkem Erhitzen nach einer unbestimmten Zwischenfarbe tiefsmaragdgrün zu werden. Die rote Farbe verschwindet sofort auf Zusatz von Wasser. Ein charakteristischer Absorptionsstreifen ist nicht vorhanden.

Die Ausbeute an diesem Körper war unter den geschilderten Bedingungen so gering, daß kaum zu hoffen war, die zur Analyse nötige Menge Substanz zu erhalten. Da nun bei der Reduktion mit Zinn und Salzsäure in der Wärme eine erhebliche Bromphenylmerkaptanabspaltung stattgefunden hatte und hierin möglicherweise der Grund für die spärliche Ausbeute zu suchen war, so habe ich versucht, ob vielleicht eine gelindere Reduktion in der Kälte bei Abwesenheit von überschüssiger Salzsäure ein besseres Resultat liefern würde.

2. Versuch.

Da wiederholt beobachtet worden ist, daß Säureester leichter reduziert werden als die Säuren selbst, so habe ich den Chlorbromphenylthiopropionsäureester der Reduktion unterworfen.

Chlorbromphenylthiopropionsäureäthylester.

3 g Chlorbromphenylthiopropionsäure (aus Versuch 2, S. 495) werden in der fünffachen Menge absoluten Alkohols gelöst und die Lösung mit Salzsäure gesättigt. Der gebildete Ester wird mit Kochsalzlösung abgeschieden, mit Äther aufgenommen und die ätherische Lösung mit verdünnter Sodalösung gewaschen. Nach Abdestillieren des Äthers hinterbleiben 3 g Chlorbromphenylthiopropionsäureäthylester, was einer Ausbeute von 91 Proz. entspricht.

Reduktion des Chlorbromphenylthiopropionsäureäthylesters.

3 g Ester werden in 30 ccm Äther gelöst, mit 12 g frisch bereitetem Aluminiumamalgam versetzt und unter tropfenweisem Zusatz von Wasser sechs Stunden reduziert. Darauf wird vom unverbrauchten Amalgam und der gebildeten Tonerde filtriert, der Äther abdestilliert und der zurückbleibende Ester verseift.

Bromphenylthiomilchsäure.

Zur Verseifung wird der Ester mit der zehnfachen Menge verdünnter Salzsäure (1 Tl. rauchende Salzsäure, 2 Tle. Wasser) zwei Stunden am Rückflußkühler gekocht. Auch jetzt ist deutliche Merkaptanabspaltung vorhanden. Die noch warme Flüssigkeit wird mit Soda alkalisch gemacht, die Sodalösung mit Äther zur Entfernung von etwa noch vorhandenem Merkaptan wiederholt ausgeschüttelt und mit Salzsäure angesäuert. Aus der frisch bereiteten Lösung kristallisiert das gesuchte Reduktionsprodukt sehr rasch in schönen Blättchen, die nach einmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser analysenrein sind. Ihre Menge beträgt 0,4 g.

Die Substanz gibt die oben erwähnte Farbenreaktion mit konzentrierter Schwefelsäure, ihr Schmelzpunkt liegt bei 115 bis 116°.

Bei der Elementaranalyse wurden folgende Zahlen erhalten:

0,1799 g im Vakuum zur Konstanz getrocknete Substanz
gaben 0,2756 g CO_2, entspr. 41,78 Proz. C
und 0,0604 „ H_2O, „ 3,76 „ H.

Diese Zahlen ergeben, daß die vorliegende Substanz die gesuchte Bromphenylthiomilchsäure ist.

Ber. f. $C_9H_9BrSO_2$		Gef.
C	41,46 Proz.	41,78 Proz.
H	3,47 „	3,76 „

Die Ausbeute an Bromphenylthiomilchsäure beträgt 16,5 Proz. der Theorie. (Bezogen auf Chlorbromphenylthiopropionsäureäthylester.)

Nachdem in der eben geschilderten Weise der Abbau der Merkaptursäuren zu der ihnen zugrunde liegenden Bromphenylthiomilchsäure gelungen war, handelte es sich darum, festzustellen, ob dieselbe der α- oder der β-Reihe angehört. Zu diesem Zwecke habe ich die entsprechenden Bromphenylthiomilchsäuren dargestellt, deren Synthese bisher noch nicht ausgeführt worden ist.

C. Bromphenyl-α-thiomilchsäure.

Diese Säure wurde durch Einwirkung von Bromphenylmerkaptannatrium auf α-Brompropionsäure dargestellt:

$$C_6H_4BrSNa + Br\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}}}}H = C_6H_4BrS.\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}}}}H + NaBr.$$

Das zu dieser Reduktion notwendige Bromphenylmerkaptan habe ich mir anfangs nach der Methode von Otto*) durch Reduktion von Brombenzolsulfochlorid mit Zinn und Salzsäure dargestellt. Ich erhielt aber beim Arbeiten nach dieser Methode erst brauchbare Ausbeuten, als ich beim Übertreiben des entstandenen Merkaptans mit Wasserdämpfen in der stark salzsauren Lösung durch wiederholtes Hineinwerfen von Zinkstücken eine kräftige Wasserstoffentwicklung unterhielt. Unterläßt man dies, so wird fast nur das entsprechende Disulfid erhalten. Da aber die Darstellung des Merkaptans nach dieser Methode ziemlich zeitraubend ist, so habe ich dasselbe später nach der schönen von Leuckart**) angegebenen Methode zur Gewinnung aromatischer Merkaptane dargestellt. Dieselbe besteht darin, daß sich Diazosalze mit Xanthogenaten glatt zu aromatischen Estern der Xanthogensäure umsetzen und letztere durch Alkali leicht zu Thiophenolen aufgespalten werden können.

1. p-Bromdiazobenzolchlorid und xanthogensaures Kalium.

$$C_6H_4BrN_2Cl + KS.C(S)OC_2H_5 = C_6H_4BrS.C(S)OC_2H_5 + KCl + N_2.$$

Zu einer eiskalten Lösung von 18,8 g xanthogensaurem Kalium (1 Mol.) wird

*) Berl. Ber. **10**, 939.

) Journal f. prakt. Chemie **41, 1890.

eine ebenfalls mit Eis gekühlte Lösung von 1 Molekül p-Bromdiazobenzolchlorid (dargestellt aus 20 g in üblicher Weise diazotiertem p-Bromanilin) allmählich hinzugesetzt. Es tritt gleich nach Zusatz der ersten Tropfen der Diazolösung eine hellgelbe Trübung auf, bei weiterem Zusatz scheidet sich das Additionsprodukt als braungelbe, breiige, kristallinische Ausscheidung auf der Oberfläche der Reaktionsflüssigkeit ab. Dieses Produkt ist äußerst zersetzlich, und man muß es, um einen explosiven Zerfall zu vermeiden, durch beständiges Schwenken des Gefäßes unter Wasser halten. Überläßt man es auf der Oberfläche der Flüssigkeit sich selbst, so tritt bereits bei 7° plötzliche Explosion ein, wobei die Temperatur der Flüssigkeit auf 11° steigt. Die Explosion ist aber so heftig, daß der dabei entstehende Xanthogensäurebromphenylester zum größten Teil herausgeschleudert wird. In guter Ausbeute erhält man dagegen den letzteren, wenn unmittelbar nach dem Zusatz der Diazolösung unter beständigem Schwenken des Gefäßes zu dem Reaktionsgemenge heißes Wasser in kleinen Portionen hinzugesetzt wird. Dabei zerfällt das kristallinische gelbe Additionsprodukt unter lebhafter Stickstoffentwicklung und verwandelt sich in ein schweres, braunes Öl, das auf den Boden des Gefäßes fällt.

Der so dargestellte Xanthogensäurebromphenylester bildet ein gelbbraunes eigentümlich riechendes Öl*).

2. Bromphenylmerkaptan.

21 g Xanthogensäurebromphenylester werden in 300 ccm Alkohol gelöst, die Lösung mit 16 g gepulvertem Kaliumhydroxyd versetzt und so lange im Sieden gehalten, bis eine Probe, der Flüssigkeit entnommen, auf Zusatz von Wasser klar bleibt. Nach dreitägiger Zersetzung ist dies erreicht. Darauf wird der Alkohol abdestilliert, das entstandene Merkaptan mit Schwefelsäure in Freiheit gesetzt und mit Wasserdampf unter wiederholtem Zusatz von Zink zu der schwefelsauren Lösung übergetrieben. Die Ausbeute an Bromphenylmerkaptan beträgt 87 Proz. der theoretischen Menge.

3. Bromphenylmerkaptan und α-Brompropionsäure.

3,6 g α-Brompropionsäure, 3 g Kaliumhydroxyd, 4,4 g frisch bereiteten Bromphenylmerkaptans und 15 ccm Wasser werden miteinander vermischt und in der Wärme mit so viel Alkohol versetzt, daß gerade alles gelöst ist. Die Reaktion findet bei Wasserbadtemperatur statt und ist nach dreistündigem Erwärmen beendet. Nach dieser Zeit wird die Flüssigkeit rasch abgekühlt, vom ausgeschiedenen Dibromphenyl-

---

*) Bei längerem Stehen scheiden sich aus dem Xanthogensäurebromphenylester Kristalle ab, die nach dem Abpressen auf Ton und wiederholtem Umkristallisieren aus Petroläther oder Essigäther bei 152° schmelzen. Mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, färben sie dieselbe tiefblau. Bei der Elementaranalyse der bei 110° getrockneten Substanz wurden folgende Zahlen erhalten:

0,1698 g Substanz gaben	0,2439 g CO_2,	entspr.	39,17	Proz.	C
und	0,0347 „ H_2O,	„	2,29	„	H.
0,1492 g Substanz gaben	0,2160 g CO_2,	entspr.	39,47	Proz.	C
und	0,0308 „ H_2O,	„	2,31	„	H.

disulfid (0,7) durch Filtration befreit und der Alkohol mit Wasserdampf abgeblasen. Nachdem dies geschehen ist, wird die Flüssigkeit eingeengt und mit Salzsäure übersättigt. Es findet sofort eine reichliche kristallinische Ausscheidung statt, deren Menge 3,1 g beträgt. Die Substanz wird aus heißem Wasser wiederholt umkristallisiert, dabei kristallisiert sie beim langsamen Erkalten der wässerigen Lösung in Nadeln, beim raschen Abkühlen in rhombischen Blättchen aus. Die Ausbeute an Bromphenyl-α-thiomilchsäure beträgt 61 Proz. der Theorie (berechnet für die in Reaktion getretenen Mengen).

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1746 g Substanz gaben 0,2671 g CO_2, entspr. 41,62 Proz. C
und 0,0588 „ H_2O, „ 3,77 „ H.

Ber. f. $C_9H_9BrSO_2$		Gef.
C	41,46 Proz.	41,62 Proz.
H	3,47 „	3,77 „

Die wiederholt umkristallisierte Bromphenyl-α-thiomilchsäure sintert bei 107° und schmilzt bei 112°. Mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, gibt sie keine charakteristische Farbenreaktion. Die Schwefelsäure wird braun gefärbt.

Ein Vergleich dieser Bromphenyl-α-thiomilchsäure mit der beim Abbau der Merkaptursäure erhaltenen Bromphenylthiomilchsäure ergibt also einen Unterschied der Schmelzpunkte von 3 bis 4°, ferner eine beträchtliche Differenz im Verhalten gegen konzentrierte Schwefelsäure. Die beiden Substanzen sind daher nicht identisch. Dem entspricht auch das Verhalten eines Gemisches der beiden Bromphenylthiomilchsäuren beim Erhitzen. Erhitzt man am selben Thermometer Bromphenyl-α-thiomilchsäure neben der durch Abbau der Merkaptursäuren erhaltenen Bromphenylthiomilchsäure und ein Gemisch dieser beiden Substanzen gleichzeitig, so sintert die erstere bei 107° und schmilzt bei 112°, die zweite sintert bei 112° und schmilzt bei 115 bis 116°, und das Gemisch sintert bei 92° und schmilzt bei 96 bis 105°.

D. Bromphenyl-β-thiomilchsäure.

1. Bromphenylmerkaptan und β-Jodpropionsäure.

Zu 6,1 g β-Jodpropionsäure wird in der Kälte eine Lösung von 3,9 g Kaliumhydroxyd in 20 ccm Wasser hinzugesetzt, und die Lösung mit 5,8 g Bromphenylmerkaptan in 40 ccm Alkohol versetzt. Die erhaltene Flüssigkeit wird drei Stunden am Rückflußkühler gekocht, dabei dunkelt sie zu Anfang nach, um sich bei längerem Erwärmen wieder aufzuhellen. Nach beendeter Einwirkung wird rasch abgekühlt, vom ausgeschiedenen Disulfid (0,2 g) abfiltriert und die schwach alkalische Lösung durch Eindampfen vom Alkohol befreit. Nachdem dies geschehen ist, wird in der Wärme mit Salzsäure angesäuert; der erhaltene weiße kristallinische Niederschlag wird abgesaugt, in Soda gelöst, die trübe Lösung mit Äther durchgeschüttelt, bis sie klar geworden ist, und die alkalische Lösung

mit Salzsäure übersättigt. Dabei kristallisiert das Produkt in schönen, leicht braun gefärbten Blättchen aus. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser ist die Substanz farblos. Es wurden 5,9 g Bromphenyl-β-thiomilchsäure erhalten, was einer Ausbeute von 76 Proz. entspricht.

Zur Analyse wird der Körper im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1912 g Substanz gaben 0,2915 g CO_2, entspr. 41,58 Proz. C
und 0,0619 „ H_2O, „ 3,62 „ H.

Ber. f. $C_9H_9BrSO_2$		Gef.
C	41,46 Proz.	41,58 Proz.
H	3,47 „	3,62 „

Auch auf einem anderen Wege gelang die Synthese der Bromphenyl-β-thiomilchsäure, die im Hinblick auf später zu beschreibende Versuche erwähnenswert scheint. Läßt man nämlich p-Bromdiazobenzolchlorid auf β-Thiomilchsäure einwirken, so erhält man ein schwer lösliches, gelbes Diazoadditionprodukt, das bei der Zersetzung Bromphenyl-β-thiomilchsäure liefert.

2. p-Bromdiazobenzolchlorid und β-Thiomilchsäure.

β-Thiomilchsäure*).

10 g β-Jodpropionsäure werden mit einer gesättigten Lösung von Ammoniumkarbonat bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Hierzu wird eine mit Schwefelwasserstoff gesättigte Lösung von 3 g Kaliumhydroxyd in 30 ccm Wasser gefügt und das Ganze auf dem Wasserbade zwei Stunden erwärmt. Darauf wird die Lösung ohne Rückflußkühlung über freier Flamme im schwachen Sieden gehalten, bis die Reaktion gegen Lakmuspapier sauer geworden ist. Dabei hellt sich die zu Anfang braune Flüssigkeit beträchtlich auf. Die erhaltene Flüssigkeit wird mit Salzsäure übersättigt und mit Äther wiederholt ausgeschüttelt. Nach Abdestillieren des Äthers bleibt die β-Thiosäure in quantitativer Ausbeute zurück.

3. Bromphenyl-β-thiomilcbsäure.

5,3 g β-Thiomilchsäure werden in 20 ccm Wasser gelöst und langsam unter Eiskühlung mit einer aus 8,4 g p-Bromanilin bereiteten p-Bromdiazobenzolchloridlösung versetzt. Es entsteht sofort ein hellgelber, kristallinischer Niederschlag, der in kleinen Portionen abgesaugt, auf Ton abgepreßt und in absolutem Alkohol suspendiert wird. (Das Filtrat dieses Diazoadditionsproduktes, dem vermutlich die Konstitution

$$\begin{array}{l} CH_2 . S . N_2 C_6 H_4 Br \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

*) β-Thiomilchsäure ist von Lovén durch Einwirkung von Kaliumsulfhydrat auf β-Jodpropionsäure erhalten worden. Jedoch findet sich bei Lovén weder die Methode ausführlich mitgeteilt, noch finden sich Angaben über die erhaltene Ausbeute.

zukommt, ist prächtig rot gefärbt.) Der in Alkohol suspendierte Körper löst sich in diesem in der Kälte unter reichlicher Stickstoffentwicklung zu Anfang mit gelber, allmählich mit rotbrauner Farbe. Nachdem die Stickstoffentwicklung aufgehört hat, wird der Alkohol unter vermindertem Druck bis auf wenige ccm abdestilliert, der Rückstand im Scheidetrichter mit Äther aufgenommen und die ätherische Lösung mit Sodalösung wiederholt durchgeschüttelt. Beim Ansäuern werden jedoch aus der Sodalösung nur spärliche Kristalle von Bromphenyl-β-thiomilchsäure erhalten. Dagegen gelingt es, die gesuchte Substanz aus dem ätherischen Auszug zu isolieren. Nach Abdestillieren des Äthers wird der hinterbleibende ölige, esterartig riechende Rückstand mit 60 ccm verdünnter Salzsäure (1 Tl. Salzsäure, 2 Tle. Wasser) zwei Stunden unter Rückflußkühlung gekocht. Darauf wird mit 20proz. Sodalösung alkalisch gemacht und von einer geringen braunen Ausscheidung abfiltriert. Beim Ansäuern fällt die gesuchte Bromphenyl-β-thiomilchsäure in schönen blättrigen Kristallen aus. Zur Reinigung wird dieselbe in Soda gelöst, die Lösung mit Äther ausgeschüttelt, bis derselbe keine gelbgefärbten Verunreinigungen mehr aufnimmt, die alkalische Lösung über Tierkohle heiß filtriert und angesäuert. Das so erhaltene Produkt wird einige Male aus Petroläther, zum Schluß aus heißem Wasser umkristallisiert.

Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz gab bei der Analyse die für Bromphenylthiomilchsäure verlangten Zahlen.

0,1348 g Substanz gaben 0,2053 g CO_2, entspr. 41,55 Proz. C
und 0,0455 g H_2O, „ 3,78 „ H.

Ber. f. $C_9H_9BrSO_2$		Gef.
C	41,46 Proz.	41,55 Proz.
H	3,47 „	3,78 „

Der Schmelzpunkt der nach beiden Methoden erhaltenen Bromphenyl-β-thiomilchsäure wie derjenige ihres Gemisches liegt bei 115 bis 116°. Mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, färbt die Substanz die Schwefelsäure kirschrot, bei stärkerem Erhitzen geht diese Farbe nach einer unbestimmten Zwischenfarbe in Smaragdgrün über.

Schmelzpunkt, Kristallform und Farbenreaktion zeigen also, daß diese Bromphenyl-β-thiomilchsäure mit der beim Abbau der Merkaptursäuren erhaltenen Bromphenylthiomilchsäure identisch ist. Dem entspricht auch das Verhalten eines Gemisches dieser beiden Substanzen beim Erhitzen. Beide Säuren wie ihr Gemisch am selben Thermometer gleichzeitig erhitzt schmelzen scharf bei 115 bis 116°.

Die den Merkaptursäuren zugrunde liegende Bromphenylthiomilchsäure gehört also der β-Reihe an. Daraus ergibt sich, daß die von Baumann aus dem Auftreten von Brenztraubensäure bei der Alkalispaltung der Merkaptursäuren gezogene Schlußfolgerung, daß der den Merkaptursäuren zugrunde liegende

Propionsäurekern $\alpha\alpha$-substituiert ist, irrtümlich ist. Die Entstehung der Brenztraubensäure muß hier ebenso wie beim Cystin als ein sekundärer Prozeß aufgefaßt werden, ein Vorgang, dessen innerer Chemismus allerdings erneuter Untersuchung bedarf.

Die Bildung von Bromphenyl-β-thiomilchsäure unter den geschilderten Bedingungen zeigt ferner, daß von den drei für das Bromphenylcystein und daher auch für die Merkaptursäuren möglichen Formeln:

I	II	III
CH_3	$CH_2 . SC_6H_4Br$	$CH_2 . NH_2$
|	|	|
$NH_2—C—SC_6H_4Br$	$CH . NH_2$	$CH . SC_6H_4Br$
|	|	|
COOH	COOH	COOH

Bromphenylcystein

Formel I und III zu verwerfen sind, und diese Substanzen der Formel II entsprechend als Derivate einer α-Aminobromphenyl-β-thiomilchsäure anzusprechen sind:

$$\begin{array}{l} CH_2 . SC_6H_4Br \\ | \\ CH . NH . CO . CH_3 \\ | \\ COOH \end{array}$$

Bromphenylmerkaptursäure.

Die Konstitution der oben beschriebenen Umwandlungsprodukte des Bromphenylcysteins kann jetzt, wie folgt, formuliert werden:

$CH_2 . SO_2C_6H_4Br$	$CH_2 . SC_6H_4Br$	$CH_2 . SO_2C_6H_4Br$
|	|	|
CH . OH	CH . Cl	$CH . NH_2$
|	|	|
COOH	COOH	COOH
Oxybromphenylsulfopropionsäure	Chlorbromphenylthiopropionsäure.	Aminobromphenylsulfopropionsäure.

Durch den Nachweis, daß die den Merkaptursäuren zugrunde liegende Bromphenylthiomilchsäure der β-Reihe angehört, ist ein direkter chemischer Zusammenhang dieser Körper mit dem Eiweißcystein gegeben, insofern als die Merkaptursäuren auf Grund der mitgeteilten experimentellen Daten als Substitutionsprodukte des Eiweißcysteins, dessen Konstitution als α-Amino-β-thiomilchsäure ich vor kurzem bewiesen habe, angesehen werden müssen:

$CH_2 . SH$	$CH_2 . SC_6H_4X$
|	|
$CH . NH_2$	$CH . NH . CO . CH_3$
|	|
COOH	COOH
Eiweißcystein	Merkaptursäure.

Ich habe mich bemüht, die Richtigkeit dieser Auffassung experimentell zu prüfen, und versucht, die Merkaptursäuren vom Eiweißcystein aus aufzubauen.

III.

Überführung des Eiweißcysteins in Bromphenylmerkaptursäure.

Der Weg, den ich bei dieser Überführung gegangen bin, ergab sich mir aus der Beobachtung, daß β-Thiomilchsäure mit p-Bromdiazobenzolchlorid ein schwer lösliches Additionsprodukt gibt, das bei seiner Zersetzung Bromphenylthiomilchsäure liefert. Ich habe versucht, diese Reaktion auf das Cystein zu übertragen, in der Hoffnung, aus dem entstehenden Additionsprodukt Bromphenylcystein gewinnen zu können.

1. Cysteinchlorhydrat.

Cystin, aus Haaren dargestellt, wird mit der zehnfachen Menge verdünnter Salzsäure (1 Tl. rauchende Salzsäure, 2 Tle. Wasser) übergossen, mit granuliertem Zinn versetzt und nach Zusatz einiger Tropfen einer 1 proz. Platinchloridlösung auf dem Wasserbade ein bis zwei Stunden reduziert. Darauf wird die Flüssigkeit mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnt, vom Zinn durch Einleiten von Schwefelwasserstoff befreit und zur Trockne eingedampft. Dabei bleibt das Cysteinchlorhydrat als weiße, kristallinische Masse in annähernd quantitativer Ausbeute zurück.

2. p-Bromdiazobenzolchlorid und Cysteinchlorhydrat.

10 g Cysteinchlorhydrat werden in der fünffachen Menge Wasser gelöst, die Lösung wird mit Eis gekühlt und mit einer ebenfalls gekühlten Lösung der berechneten p-Bromdiazobenzolchloridlösung (1 Mol.) versetzt. Es entsteht sofort ein voluminöser gelber Niederschlag, die Flüssigkeit selbst ist prächtig rot gefärbt. Das Additionsprodukt bildet sich jedoch erst vollständig beim Erwärmen der Reaktionsflüssigkeit auf 35°. Dabei erstarrt sie zu einem dicken zeisiggelben Brei. Das Ganze wird unter häufigem Rühren eine halbe Stunde auf 35° gehalten, darauf langsam erkalten gelassen, abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und auf Ton abgepreßt.

Dieses Additionsprodukt ist durch ungewöhnliche Beständigkeit ausgezeichnet. Mit Wasser erhitzt, zeigt es erst bei 80° geringe Zeichen einer beginnenden Zersetzung, um gegen 100° unter reichlicher Stickstoffentwicklung zu zerfallen. Trocken erhitzt, konnte es nicht zur Explosion gebracht werden.

3. Bromphenylcystein.

Die Zersetzung dieses Additionsproduktes in dem Sinne, daß der Bromphenylrest unter Stickstoffentwicklung an den Schwefel des Cysteins gekuppelt würde:

$$\begin{array}{l} CH_2 . S . N_2C_6H_4Br \\ | \\ CH . NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2 . S . C_6H_4Br \\ | \\ CH . NH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

war mit großen Schwierigkeiten verbunden, der größte Teil des Cysteins wurde bei allen dahinzielenden Versuchen als solches oder als Cystin abgespalten, und daher waren die Ausbeuten an Bromphenylcystein recht spärliche. Als Zersetzungsmittel wurden benutzt: Wasser, stark verdünnte Salzsäure, Methylalkohol, Weingeist, Äthylalkohol, Eisessig und Kupferpulver. Bromphenylcystein konnte bei der Zersetzung des Additionsproduktes mit Wasser, wässerigem Methylalkohol und Weingeist erhalten werden, jedoch lieferten durchschnittlich 3 g Cystin nur 0,3 g Bromphenylcystein. Brauchbare Ausbeuten erhielt ich erst, als ich verdünnte Sodalösung zur Aufspaltung benutzte. Hierbei wurde, wie folgt, verfahren.

10 g Cysteinchlorhydrat werden in der oben geschilderten Weise in Bromdiazobenzolcystein übergeführt. Das auf Ton abgepreßte Produkt wird in 50 ccm Wasser suspendiert und bei Wasserbadtemperatur langsam gerade die zur Lösung des Produktes nötige Menge einer 20proz. Sodalösung hinzugefügt. Die Flüssigkeit wird so lange gelinde erwärmt, als noch Stickstoffentwicklung stattfindet. Dabei tritt reichliche Bromphenolabspaltung auf. Nach beendeter Stickstoffentwicklung wird die noch warme Flüssigkeit von dem an dem Boden und an den Wänden des Gefäßes haftenden Phenol abgegossen und sofort mit verdünnter Essigsäure angesäuert. Der beim Ansäuern entstehende Niederschlag wird nach dem Erkalten, das durch Kühlen gegen fließendes Wasser beschleunigt wird, sogleich abgesaugt, zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol ausgewaschen und auf Ton abgepreßt. Es konnten 5,4 g dieses Niederschlages erhalten werden.

Es ergab sich sowohl aus den Eigenschaften des Produktes, wie aus den bei der Analyse erhaltenen Zahlen, daß dieser Körper ein Gemenge von Bromphenylcystein und Cystin darstellt. Die Trennung dieser beiden Substanzen gelang mit Hilfe von Eisessig.

5,4 g dieses Niederschlages werden mit Eisessig wiederholt ausgekocht, solange der Eisessig noch sichtlich Substanz aufzunehmen vermag. Vom ungelösten Cystin (1,9 g) wird in der Wärme abfiltriert, das zuerst erhaltene Filtrat wird für sich aufbewahrt, die späteren werden vereinigt. Beim Erkalten scheidet das erste Filtrat 1,4 g Substanz aus, die nach zwölfstündigem Stehen in der Kälte filtriert werden. Das Filtrat wird mit den übrigen Eisessigauszügen vereinigt und der Eisessig und wenig Phenol mit Wasserdampf abgetrieben. Nach zweistündiger Destillation wird die heiße Flüssigkeit filtriert, mit Ammoniak nahezu neutralisiert und mit Ammoniumkarbonat schwach übersättigt. Nach eintägigem Stehen im Eisschrank wird das erhaltene Produkt abgesaugt, zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol ausgewaschen. Seine Menge beträgt 1,7 g.

Das so erhaltene Präparat enthält keinen locker gebundenen Schwefel mehr. Eine Probe mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, färbt diese schön blaugrün. Mit Alkali gekocht, spaltet es Ammoniak und Bromphenylmerkaptan ab. In der mit Soda

und Salpeter erhaltenen Schmelze ist reichlich Brom und Schwefelsäure vorhanden.

Zur Analyse wurde die Substanz durch wiederholtes Lösen in Ammoniak und Fällen mit Essigsäure gereinigt und bei 100° getrocknet.

0,1680 g Substanz gaben 0,2432 g CO_2, entspr. 39,49 Proz. C
und 0,0579 „ H_2O, „ 3,86 „ H.
0,1371 g Substanz gaben 6,85 ccm N (21,5°, 755 mm), entspr. 5,63 Proz. N.

Diese Zahlen ergaben, daß die vorliegende Substanz Bromphenylcystein ist.

	Ber. f. $C_9H_{10}BrSNO_2$	Gef.
C	39,18 Proz.	39,49 Proz.
H	3,65 „	3,86 „
N	5,08 „	5,63 „

Die Ausbeute an Bromphenylcystein beträgt 16 Proz. der Theorie.

Der Schmelzpunkt dieses Bromphenylcysteins liegt bei 181°, bei derselben Temperatur schmilzt sowohl das aus Merkaptursäuren erhältliche Bromphenylcystein, wie ein Gemisch beider Bromphenylcysteine. Beide Substanzen geben ferner dieselbe Farbenreaktion mit konzentrierter Schwefelsäure und zeigen in ihrem ganzen chemischen Verhalten völlige Übereinstimmung.

Es mag hervorgehoben werden, daß beide Substanzen leicht in einen Körper vom Schmelzpunkt 192 bis 193° durch kurze Einwirkung verdünnter Salzsäure und nachheriges Neutralisieren mit Ammoniak umgewandelt werden können. Auch Baumann und Preuße*) sind diesem Körper bei der Zersetzung der Merkaptursäuren durch zu langes Kochen mit Säuren begegnet und geben an, daß er sich von dem bei 181° schmelzenden Bromphenylcystein nur durch den Schmelzpunkt unterscheidet, während ihm sonst alle Eigenschaften des Bromphenylcysteins zukommen.

In der Tat gab der nach kurzer Einwirkung verdünnter Salzsäure auf synthetisches Bromphenylcystein erhaltene Körper (Schp. = 192 bis 193°) bei der Analyse noch die für Bromphenylcystein verlangten Zahlen.

0,1698 g Substanz gaben 0,2466 g CO_2, entspr. 39,51 Proz. C
und 0,0588 „ H_2O, „ 3,88 „ H.
0,1431 g Substanz gaben 7,00 ccm N (761 mm, 21,5°), entspr. 5,55 Proz. N.

	Ber. f. $C_9H_{10}BrSNO_2$	Gef.
C	39,18 Proz.	39,51 Proz.
H	3,62 „	3,88 „
N	5,08 „	5,55 „

*) Baumann und Preuße, l. c., S. 317.

Der aus einem Bromphenylcystein, das aus Merkaptursäuren gewonnen war, analog dargestellte Körper hatte ebenfalls den Schmelzpunkt 192 bis 193°, ebenso ein Gemisch beider Substanzen. Beide Körper unterscheiden sich aber vom Bromphenylcystein vom Schmelzpunkt 181° durch ihre relative Schwerlöslichkeit in Ammoniak.

Welcher Art die hier augenscheinlich vorliegende Isomerie ist, habe ich aus Mangel an Material vorläufig nicht entscheiden können. Eine naheliegende Deutung wäre, daß der höher schmelzende Körper der Racemkörper des ursprünglichen Bromphenylcysteins wäre, eine Vermutung, die einige Wahrscheinlichkeit hat, weil er unter Bedingungen auftritt, wo eine Racemisierung möglich ist. Die experimentelle Prüfung dieser Vermutung behalte ich mir für eine spätere Gelegenheit vor.

Es sei erwähnt, daß das Bromphenylcystein vom Schmelzpunkt 192 bis 193° mit der oben beschriebenen Aminobromphenylthiopropionsäure (S. 494) identisch ist.

4. Bromphenylmerkaptursäure.

Die Einführung des Acetylrestes in das Bromphenylcystein ist nach den vorliegenden Versuchen von Baumann mit Schwierigkeiten verbunden. Sie gelang Baumann erst, als er Essigsäureanhydrid, das mit dem zehnfachen Volumen Benzol verdünnt war, mit Bromphenylcystein zur Reaktion brachte*). Bei Wiederholung dieser Versuche habe ich jedoch nur Spuren von Bromphenylmerkaptursäuren erhalten können. Schon nach kurzer Einwirkung von Essigsäureanhydrid wurde das Bromphenylcystein in das oben beschriebene Bromphenylcystein vom Schmelzpunkt 192 bis 193° umgewandelt. Dagegen habe ich auf einem anderen Wege Bromphenylmerkaptursäure leicht erhalten können.

0,5 g aus Cystein dargestelltes Bromphenylcystein werden in Pyridin suspendiert und tropfenweise unter Kühlung mit Acetylchlorid versetzt, bis alles in Lösung gegangen ist. Die Lösung erfolgt bereits nach Zusatz weniger Tropfen Acetylchlorid. Nach einigem Stehen wird mit Salzsäure angesäuert. Die dabei entstehende ölige Ausscheidung wird nach zwölfstündigem Stehen in der Kälte von der Mutterlauge getrennt, das ausgeschiedene Reaktionsprodukt und die Mutterlauge werden für sich verarbeitet.

Die ölige Ausscheidung wird in Ammoniak gelöst, die Lösung durch wiederholtes Filtrieren von bei der Reaktion entstandenem Dibromphenyldisulfid befreit und von neuem mit Salzsäure angesäuert. In der Regel fällt jetzt das Acetylprodukt sofort kristallinisch aus, mitunter aber erst

*) Baumann, Berl. Ber. 18, 266.

nach mehrtägigem Stehen in der Kälte. Es wird, nachdem es wiederholt in Ammoniak gelöst und mit Salzsäure gefällt worden ist, in wenig Alkohol gelöst und die alkoholische Lösung in heißes Wasser gegossen, worauf nach längerem Stehen das Acetylprodukt auskristallisiert.

Das so gewonnene Produkt kristallisiert in schönen Nadeln. Dieselben lösen sich in Sodalösung unter Aufbrausen. Mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, färben sie diese tiefblau. Die Kristalle schmelzen bei 152 bis 153°. Bei derselben Temperatur schmilzt die aus Hundeharn erhältliche Bromphenylmerkaptursäure. Beide Substanzen, gemischt, schmelzen ebenfalls scharf bei 152 bis 153°. Die beiden Substanzen sind daher identisch. Damit dürfte der völlige Aufbau der Merkaptursäuren vom Cystein aus gelungen sein.

Die Ausbeute an Bromphenylmerkaptursäure ist unter den geschilderten Bedingungen eine äußerst geringe. Es konnte gerade die zur Identifikation nötige Menge Substanz gewonnen werden. Die Hauptmenge des Reaktionsproduktes befindet sich in der Mutterlauge der beim ersten Ansäuern erhaltenen öligen Ausscheidung und wurde in folgender Weise isoliert.

Die abgegossene Mutterlauge wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit Natronlauge alkalisch gemacht, die alkalische Lösung mit Äther wiederholt ausgeschüttelt und mit Salzsäure angesäuert. In der trüben Lösung beginnt beim Reiben der Gefäßwände mit einem scharfen Glasstabe sofort eine reichliche Kristallisation. Nach zwölfstündigem Stehen werden die Kristalle abgesaugt, in Ammoniak gelöst, die ammoniakalische Lösung wiederholt filtriert und das klare Filtrat mit Salzsäure angesäuert. Die erhaltenen Kristalle werden in wenig Alkohol gelöst und die Lösung in heißes Wasser gegossen. Beim langsamen Erkalten scheidet sich die Substanz in farblosen Kristallen aus. 0,5 g Bromphenylcystein lieferten 0,3 g dieses Produktes.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,1240 g Substanz gaben 0,1893 g CO_2, entspr. 41,63 Proz. C.
und 0,0441 „ H_2O, „ 3,98 „ H.

Diese Zahlen sprechen für ein Acetylbromphenylcystein.

Ber. f. $C_{11}H_{12}BrSNO_3$		Gef.
C	41,51 Proz.	41,63 Proz.
H	3,80 „	3,98 „

In der Tat lösen sich die Kristalle in Sodalösung unter Aufbrausen, mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, färben sie diese tiefblau. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 153 bis 154°. Nach diesen Eigenschaften könnte man geneigt sein, dieses Acetylbromphenylcystein mit Bromphenylmerkaptursäure für identisch zu halten. Dieses scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Das Produkt unterscheidet sich von der entsprechenden Merkaptursäure durch seine Kristallform. Betrachtet man nämlich das erhaltene Acetylbromphenylcystein genau unter dem Mikroskop, so sieht man, daß die Kristalle platte Nadeln darstellen, und dort, wo sie als reine Nadeln imponieren, kann man sich unschwer davon überzeugen, daß man es mit Platten, die auf die Kante gestellt sind, zu tun hat. Erhitzt man ferner ein Gemisch von aus Hundeharn dargestellter Brom-

phenylmerkaptursäure mit diesem Acetylbromphenylcystein, so sintert dieses Gemisch bereits bei 142°, beginnt bei 146° zu erweichen, und diese erweichte, halbflüssige undurchsichtige Masse hellt sich scharf bei 152 bis 153° auf. Bromphenylmerkaptursäure schmilzt dagegen bei 152 bis 153°, ohne vorher zu erweichen. Da ich nun beobachtet hatte, daß Bromphenylcystein vom Schmelzpunkt 181° leicht durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid in ein isomeres Produkt vom Schmelzpunkt 192 bis 193° übergeführt werden konnte, eine ähnliche intermediäre Umwandlung aber auch unter den von mir eingehaltenen Bedingungen der Acetylierung möglich war und ferner Bromphenylcystein vom Schmelzpunkt 192 bis 193° ein anderes Acetylprodukt liefern konnte, so habe ich zum Vergleich ein aus Hundeharn stammendes, in Bromphenylcystein vom Schmelzpunkt 192 bis 193° umgewandeltes Produkt unter den geschilderten Bedingungen acetyliert und in der Tat einen in platten Nadeln kristallisierenden Körper vom Schmelzpunkt 153 bis 154° erhalten, der mit dem erwähnten Acetylbromphenylcystein identisch war. Es scheint sich also unter den Acetylprodukten dieselbe Isomerie wiederzufinden, die bereits bei Besprechung des Bromphenylcysteins erwähnt war, eine Isomerie, die erst ihre Deutung nach Klarstellung der beim Bromphenylcystein eintretenden Umwandlung finden kann. Ich behalte mir vor, die zur Lösung dieser Frage einschlägigen Versuche später auszuführen.

Durch die Überführung des Cysteins in Bromphenylmerkaptursäure findet die bereits bewiesene β-Stellung des Bromphenylmerkaptanrestes in den Merkaptursäuren eine erneute Bestätigung. Gleichzeitig wird die α-Stellung der Aminogruppe, die bisher nur durch indirekte Beweisgründe zu stützen war, auf direktem Wege einwandsfrei bewiesen.

Der chemische Nachweis, daß die Merkaptursäuren substituierte Cysteine sind, macht ferner die physiologische Schlußfolgerung, die ich in einer früheren Arbeit auf Grund der Konstitution der Eiweißcysteine einerseits, wie auf Grund der von Baumann angenommenen Konstitution der Merkaptursäuren andererseits gezogen habe, daß der Organismus über zwei Cysteine verfügt, ein α-Cystein der Merkaptursäuren und ein β-Cystein der Eiweißkörper, hinfällig, da sich beide Cysteine als identisch erwiesen haben. Der Befund von α-Thiomilchsäure unter den Spaltungsprodukten der Keratinsubstanzen wie der Eiweißkörper läßt sich zwar noch zugunsten des Vorhandenseins eines α-Cysteins deuten, aber die Bedingungen, unter denen diese Säure bisher aufgefunden und isoliert worden ist, schließen die Möglichkeit einer Umwandlung des β-Cysteins in α-Thiomilchsäure nicht völlig aus, und es erhebt sich die Frage, ob die geschwefelte Vorstufe

der α-Thiomilchsäure, deren ich früher Erwähnung tat, nicht im Cystin selber zu suchen ist, eine Frage, mit deren Beantwortung ich beschäftigt bin.

Nach der physiologischen Seite ergibt die vorstehende Untersuchung, daß die Merkaptursäurebildung im Organismus des Hundes eine experimentelle Cystinurie ist. Die sich aus dieser Tatsache ergebenden Fragen nach dem Material, das der Organismus zu dieser Synthese verwendet, nach der Lokalisation dieses komplizierten, augenscheinlich in drei Phasen verlaufenden Vorganges, wie nach den Gründen der Ausscheidung dieser unvollständig oxydierten Produkte hoffe ich auf tierexperimentellem Wege einer Lösung entgegenzuführen.

XXXIX.

Über das zuckerzerstörende Ferment in den Organen.

Von Dr. **J. Feinschmidt** aus Charkow, Volontärarzt an der I. medizinischen Klinik in Berlin.

Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik zu Berlin.

Die Tatsache, daß der normalerweise im Blut enthaltene Traubenzucker beim Stehenlassen des der Zirkulation entzogenen Blutes ziemlich rasch verschwindet, war schon Claude Bernard bekannt. So z. B. berichtet er*), daß im Blut von einem Hunde, das im Laboratorium bei einer Temperatur von 15° gestanden hat, der Zuckergehalt betrug:

unmittelbar nach der Entnahme des Blutes	1,07 p. m.
nach 10 Minuten	1,01 „ „
„ 30 „	0,88 „ „
„ 5 Stunden	0,44 „ „
„ 24 „	0,00 „ „

Diese Versuche sind seinerzeit von Pavy**) bestätigt worden, der allerdings nur ein langsameres Verschwinden des Zuckers beobachtete. Die Zerstörung des Zuckers im Blut ist nach Claude Bernard***) abhängig von einem Milchsäureferment, das im Blut, in den Muskeln und in der Leber vorhanden ist. Die Alkalien des Blutes begünstigen bloß den Vorgang.

Diese Untersuchungen blieben ziemlich unbeachtet, bis Lépine sie wieder aufnahm und mit der Frage des Stoffwechsels, namentlich mit der des Diabetes, in Beziehung brachte.

Lépine nahm an†), daß in normalem Blut ein zuckerzerstörendes Ferment „ferment glycolytique“ vorhanden ist. Die

---

*) Claude Bernards Vorlesungen über den Diabetes, deutsch von Karl Posner. Berlin 1878, S. 120.

**) Pavy, Vortrag in der Londoner Royal Society. Cf. Zentralblatt f. d. ges. med. Wissenschaft. Nr. 33, 1877.

***) loc. cit. S. 195.

†) Lépine, Le ferment glycolytique et la pathogénie du diabète. Paris 1891. Die Beziehungen des Diabetes zu Pankreaserkrankungen, Autoreferat in der Wiener mediz. Presse, Nr. 27—32, 1892. Semaine méd. seit 1891 u. ff. Compt. rend. de la soc. de biol. seit 1891. Deutsche med. Wochenschr. 1892, S. 57.

Spaltung des Zuckers ist keineswegs eine Funktion der Zelltätigkeit der Blutkörperchen, da das Ferment sich nach dem Abzentrifugieren der letzteren aus denselben mit Chlornatriumlösung extrahieren läßt; die Glykolyse ist auch nicht an das Serum gebunden, da dieses eine viel geringere zuckerzerstörende Kraft besitzt als die Blutkörperchen. Auch die Erythrocyten sind nicht die Träger des Fermentes: der Chylus, der fast keine roten Blutkörperchen enthält, zeigt eine bedeutend höhere glykolytische Kraft als das Blut. Lépine konnte in abzentrifugiertem Blut nachweisen, daß die zuckerzerstörende Wirkung in verschiedenen Schichten der Blutkörperchen proportional ihrem Gehalte an Leukocyten war. Das glykolytische Ferment bildet sich nach Lépine nicht bloß in vitro, sondern es spaltet sich auch intra vitam von den Leukocyten ab.

Die epochemachende Entdeckung von Mering und Minkowski*), daß Hunde, bei denen das Pankreas extirpiert wurde, diabetisch werden, veranlaßte Lépine zu einer großen Reihe von Untersuchungen, die ihm folgende Resultate ergaben.

Durch Reizung des Pankreas auf verschiedene Art, gelang es ihm, die Glykolyse zu vermehren: bei Veränderung der Zirkulation in der Drüse infolge von Durchschneidung ihrer Nerven, sowie beim Abbinden des ductus Wirsungianus, wobei durch Gegendruck die Pankreaszellen gereizt werden, wird die zuckerzerstörende Kraft des Blutes vermehrt; dagegen wird sie bei Ausschaltung der Drüse vermindert. Ferner fand er, daß die glykolytische Wirkung des Blutes der Pankreasvene bedeutend höher ist als die des Blutes der Milzvene. Daraus glaubt er schließen zu dürfen, daß das Pankreas die Fähigkeit besitzt, ein lösliches zuckerzerstörendes Ferment zu bilden, welches aber gleich bei seiner Bildung in das Blut ergossen und daselbst von den Leukocyten aufgenommen wird.

Da die Glykolyse im Blut von ihres Pankreas beraubten Hunden seinen Versuchen zufolge vermindert ist, nimmt er an, daß der Diabetes bei ihnen wenigstens zum großen Teil durch die Ausschaltung der Bildungsstätte für das zuckerzerstörende Ferment bedingt ist.

Die Ursache der Zuckerausscheidung im Harn des Diabetikers beruht nach Lépine im wesentlichen auf einer Überlastung des Blutes mit Zucker infolge Verminderung der glykolytischen Kraft des Blutes, die mit der Affektion des Pankreas parallel geht.

*) Mering und Minkowski, Archiv f. exp. Path. u. Therapie **26**, 371.

Dafür spricht ihm zufolge: 1. die zahlenmäßige Verminderung der Glykolyse im diabetischen Blut; 2. bei einem durch Pankreasexstirpation diabetisch gemachten Hund konnte er durch Infusion von normalem, also fermenthaltigem, Chylus in die Blutbahn die Zuckerausscheidung im Harn für einige Stunden bedeutend herabsetzen.

Die Lehre Lépines vom glykolytischen Ferment und seinen Beziehungen zum Diabetes ist fast in sämtlichen Punkten von verschiedenen Autoren bestritten worden. Sehen wir zu, ob mit Recht?

Zunächst, was den Zusammenhang des glykolytischen Fermentes mit dem Diabetes melitus anbetrifft, so nehmen Chauveau und Kaufmann*) an, daß beim Diabetes nicht ein ungenügender Zuckerverbrauch, sondern eine übermäßige Zuckerproduktion stattfindet. Das Pankreas spielt dabei bloß die Rolle eines Regulationsapparates für die zuckerbildende Funktion der Leber; die letztere Funktion ist von zwei nervösen Zentren abhängig: einem hemmenden und einem erregenden. Die Tätigkeit des Pankreas reizt das hemmende und hemmt das erregende; umgekehrt wirkt die Zerstörung des Pankreas.

Minkowski**) hält es für möglich, daß beim Diabetes das Pankreas direkt oder auf nervösem Wege die zuckerverbrennenden Organe beeinflussen kann, ohne daß es auf das Zuckermolekül direkt einwirkt.

Weiter bestreiten Seegen***), Minkowski†), Arthus††), Kraus†††), Spitzer*†) u. a. die Angabe Lépines, daß beim Pankreasdiabetes das glykolytische Ferment vermindert sei.

Dagegen fanden Achard und Weil**†) in drei Fällen von Diabetes zweimal die glykolytische Kraft des Blutes vermindert und glauben, daß der Mangel an Glykolyse ein Attribut des echten Diabetes sei.

Biernacki***†) fand in fünf Diabetesfällen „auffallend niedrige Werte des oxydierten Traubenzuckers im Vergleich mit sonstigen

*) Chauveau u. Kaufmann, Compt. rend. Nr. 67 ff., 1893.

**) Minkowski, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 5, 1892. Arch. f. exp. Path. u. Ther. 31, 175 (1893).

***) Seegen, Wiener klin. Wochenschr. Nr. 14, 15, 1895. Centralbl. f. Physiol. 5, 121.

†) Minkowski, loc. cit.

††) Arthus, Glycolyse dans le sang et le ferment glycolytique. Arch. de physiol. 1891, S. 425; 1892, S. 387.

†††) Fr. Kraus, Zeitschr. f. klin. Medizin 21, 315 (1892).

*†) Spitzer, Berl. klin. Wochenschr. 1894, S. 949. Pflügers Arch. 1895 und 1897.

**†) Achard u. Weil, Compt. rend. 1898.

***†) Biernacki, Zeitschr. f. klin. Medizin 41, 332 (1900).

pathologischen Fällen". Er meint, daß die Ergebnisse von Kraus und Spitzer gegenüber den Lépineschen Angaben nicht ganz ins Gewicht fallen können, da sie ihre Versuche nicht unter den gleichen Bedingungen (gleichen Zucker- und Blutmengen) wie Lépine angestellt hatten.

Auch die Angabe von Lépine über den größeren Reichtum der Pankreasvene an glykolytischem Ferment im Vergleiche zu anderen Venen und Arterien ist von verschiedener Seite bezweifelt worden. So konnten Arthaud und Butte*) nach Unterbindung der Pankreasvene keine Vermehrung des Zuckers im Blut konstatieren. Ebenso fanden die Gebrüder Cavazzani**) bei gleicher Versuchsanordnung die glykolytische Kraft des Blutes nicht herabgesetzt. Pal***) bestimmte den Zuckergehalt in dem zu- und abführenden Blut des Pankreas und fand dabei keine nennenswerten Unterschiede. Umber†) kommt auf Grund seiner Experimente zu folgendem Resultate: „Das Venenblut verhält sich in seiner glykolytischen Eigenschaft wie das Arterienblut, und das der Vena pancreatico-duodenalis kurz vor ihrem Eintritt in die Pfortader entnommene Blut zerstört gleichfalls nicht mehr Zucker als das übrige Venen- und Arterienblut."

Was das Ferment selbst anbetrifft, so bezweifelt Hoppe-Seyler††) seine Existenz überhaupt, weil er in den von ihm angestellten Versuchen keine wesentliche Abnahme des dem Blute zugefügten Traubenzuckers konstatieren konnte.

Seegen†††), Arthus*†) u. a. halten die Glykolyse bloß für einen postmortalen Vorgang. Sie meinen, daß das zuckerzerstörende Ferment im lebenden Blut nicht präexistiere; es soll sich post mortem aus den Leukocyten, oder wie Arthus sich ausdrückt, „d'éléments figurés autres que les globules rouges" bilden.

Andere Autoren, wie Colenbrander**†), Rywosch***†), wollen wieder die zuckerzerstörende Eigenschaft des Blutes in Beziehung zu der Blutgerinnung resp. zum Fibrinferment stellen; sie fanden nämlich, daß Fluornatrium, Pepton und Blutegelextrakt, die be-

---

*) Arthaud u. Butte, Compt. rend. de soc. biol. Nr. 42, 59, 62, 1890.
) Gebrüder Cavazzani, cf. Referat, Centralbl. f. Physiol. **7, 216.
***) Pal, Wiener klin. Wochenschr. 1891, S. 64.
†) Umber, Zeitschr. f. klin. Medizin **39**, 13.
††) Hoppe-Seyler, cit. nach Kraus.
†††) Seegen, loc. cit.
*†) Arthus, loc. cit. Mém. de la soc. de biol. 1891.
**†) Colenbrander, cf. Malys, Jahresber. 1892, S. 137.
***†) Rywosch, Centralbl. f. Physiol. **11**, 495.

kanntlich auf die Entstehung von Fibrinferment hemmend wirken, auch die Glykolyse beeinträchtigen.

Dagegen behauptet Hahn*), daß die Glykolyse in keiner Weise an den Gerinnungsvorgang gebunden und von ihm ganz unabhängig sei. Er neigt sich mehr der Ansicht zu, daß die zuckerzerstörende Kraft an die Leukocyten gebunden ist, weil er bei Hyperleukocytose eine Vermehrung des Fermentes fand. Indessen fanden Loewy und Richter**) bei künstlich hervorgerufener Hyperleukocytose die glykolytische Kraft des Blutes herabgesetzt.

Während die genannten Autoren die Glykolyse für eine postmortale Erscheinung halten, sind Salkowski, Kraus, Spitzer u. a. geneigt, die zuckerzerstörende Eigenschaft des Blutes als einen oxydativen Vorgang aufzufassen. So fand Salkowski***), daß das Blut bei feiner Sprayverteilung Salizylaldehyd in reichlichen Mengen oxydiert und meint, daß das glykolytische Ferment, welches nur bei Gegenwart von Sauerstoff wirkt, mit dem Oxydationsferment identisch sei.

Kraus†) schließt aus der Bildung von Kohlensäure und der Absorption von Sauerstoff bei der Glykolyse, daß es sich dabei um eine direkte Oxydation handelt, und Spitzer††) schließt sich der Ansicht an, indem er behauptet, daß die Glykolyse „durch eine Aktivierung des molekularen Sauerstoffs bedingt sei", denn bei zweistündiger Durchleitung von Kohlensäure durch ein Blutzuckergemisch, also beim Fehlen von Sauerstoff, fand er nach 24 Stunden die dem Blut beigefügte Menge Zucker unverändert.

Indessen haben die weiteren Arbeiten von Lépine†††), Blumenthal und Mosse*†) und M. Jacoby**†) außer Zweifel gestellt, daß die Glykolyse einen selbständigen Vorgang darstellt, der weder mit der Blutgerinnung noch mit der Oxydation etwas zu tun hat.

M. Jacoby führt in seiner Arbeit sieben Momente an, die einen Unterschied zwischen dem glykolytischen und oxydativen Ferment bilden und die Spezifizität der glykolytischen Funktion beweisen.

---

*) Hahn, Berl. klin. Wochenschr. 1897, S. 499.

) Loewy u. Richter P. F., Berl. klin. Wochenschr. Nr. 47, 1897. Virchows Arch. **151, 1898.

***) Salkowski, Virchows Arch. **147**. Zeitschr. f. physiol. Chemie **7**, 115. Centralbl. f. d. med. Wissenschaften Nr. 52, 1894.

†) Fr. Kraus, loc. cit.

††) Spitzer, loc. cit.

†††) Lépine, Compt. rend. 1895, S. 139. Lyon médic. 1897.

*†) Blumenthal. Zeitschr. f. diätetische u. physik. Therapie. **1**, 3 (1898).

†) M. Jacoby, Virchows Arch. **157, 235 (1899).

Indessen traten im Laufe der Zeit in den Ansichten von Lépine über die Glykolyse wesentliche Veränderungen ein*).

Als Bildungsstätte des glykolytischen Fermentes sieht er nicht mehr das Pankreas, sondern sämtliche Gewebe an; das Pankreas spielt dabei insofern eine Rolle, als es einerseits durch seine innere Sekretion die Glykolyse begünstigt, andererseits aber als solches dadurch, daß es, unabhängig von der inneren Sekretion, einen Einfluß ausübt, vielleicht indem es Substanzen zerstört, welche die Glykolyse in den Geweben verhindern.

Blumenthal**) betrachtet die Glykolyse als einen vollkommen selbständigen und zellulären Vorgang. Er nimmt an, daß das Ferment nicht bloß im Blut, sondern in den Gewebszellen selbst vorhanden sei. Diese Ansicht bestätigte sich, als er die Buchnersche Presse zur Zertrümmerung der Zellen verwandte; er bekam dabei Preßsäfte aus den verschiedensten Organen, welche Zucker in sehr intensiver Weise zerstörten. Blumenthal hat dabei auch die Produkte, die bei der Glykolyse sich bilden, genauer zu verfolgen gesucht.

Wie erwähnt, hielt Claude Bernard***) die Glykolyse für bedingt durch die Tätigkeit eines Milchsäurefermentes, dagegen glaubten Blondeau und Huston Ford†), daß dabei eine Spaltung in Alkohol und Kohlendioxyd stattfinde. Seegen††) konnte aber bei seinen Untersuchungen weder Milchsäure noch Kohlensäure finden. Das widerspricht aber den Angaben von Kraus†††), der nachweisen konnte, daß bei der Zerstörung des Zuckers im Blut unter Sauerstoffabsorption Kohlensäure entsteht, ebenso wie den von Scheremetjewski*†), der diese Tatsache allerdings auf anderem Wege schon in den 60iger Jahren vorigen Jahrhunderts gefunden hat. Blumenthal gelang es, nachzuweisen, daß bei der Spaltung des Zuckers sich Kohlensäure in reichlichen Mengen bildet, welche er für eines der wichtigsten Produkte der Glykolyse hielt. Er sprach sich dagegen aus, daß die Glykolyse in der Art einer alkoholischen Gärung erfolge. Denn er konnte ebensowenig wie Bendix, der auf seine Veranlassung die Frage verfolgte,

---

*) Lépine, Lyon médic. Nr. 16, 1899. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 4, 1902.

**) Blumenthal, loc. cit.

***) Claude Bernard, loc. cit. S. 195.

†) cit. nach Claude Bernard, loc. cit.

††) Seegen, loc. cit.

†††) Kraus, loc. cit.

*†) Scheremetjewski, cit. nach Kraus.

mit Sicherheit Alkohol nachweisen. Indessen glaubte Umber*), der die Versuche von Blumenthal mit Pankreas wiederholte, auch die von Blumenthal beobachtete Kohlensäurebildung auf Bakterienwirkung zurückführen zu können, während Brunton und Rhodes**) durch Auspressen von Muskeln die Glykolyse in Abwesenheit von Bakterien konstatieren konnten. C. Oppenheimer***) konnte bei seinen mit frischem Blut und Zuckerlösungen angestellten Versuchen „stets eine sehr geringe Menge eines jodoformgebenden Körpers, der nicht Aceton war“, nachweisen. Es gelang ihm jedoch nicht, mit Sicherheit festzustellen, daß der gefundene Körper Alkohol war. Auch Herzog†), der sich neuerdings mit der Frage beschäftigt hat, konstatierte das Entstehen von Kohlensäure bei der bakterienfreien Glykolyse des Pankreas, kam aber auch in bezug auf das Vorkommen des Alkohols zu zweifelhaften Resultaten.

Da uns neuerdings eine Buchnersche Presse von 400 Atm. Druck zur Verfügung stand — die von Blumenthal benutzte Presse gab nur bis zu 100 Kilogramm pro qcm —, da sich überhaupt die Technik des Organpressens seit damals vervollkommnet hat, habe ich auf Anregung von Herrn Dr. Blumenthal die Frage von neuem aufgenommen.

In der Zwischenzeit haben Stoklasa und Czerny††) Versuche veröffentlicht, in denen sie mitteilen, daß es ihnen gelungen sei, durch Auspressen von Pflanzenteilen und Tierorganen mit 300 bis 400 Atm. einen Saft zu bekommen, welcher Zuckerlösung unter Kohlensäure- und Alkoholbildung vergärt, und zwar in demselben Verhältnis wie bei der Hefegärung. Zwischen ihren Versuchen und denen von Blumenthal ist insofern ein Unterschied, als Blumenthal seine Versuche aerob, Stoklasa und Czerny anaerob, und zwar in Wasserstoffatmosphäre, durchführten.

Blumenthal, Stoklasa und Czerny und seinerzeit Spitzer†††) haben das Ferment zu isolieren versucht. Blumenthal hat es mit Alkohol schnell gefällt und diesen durch Äther entfernt, welcher Methode sich ebenfalls Stoklasa und Czerny bedienten. Die von Stoklasa angewandte Versuchsanordnung hat

*) Umber, loc. cit.

**) Rhodes u. Brunton, cf. Referat Chem. Centralbl. 2, 493 (1900).

***) Carl Oppenheimer, Die Fermente 1900.

†) Herzog, Diese Beiträge 2, 102 (1902).

††) Stoklasa u. Czerny, Berichte d. deutsch. chem. Ges. 1903, Nr. 3, S. 622. Centralbl. f. Physiol. 16, 652. Diese Beiträge 3, 11, 460.

†††) Spitzer, loc. cit.

neuerdings Šimáček*) mit positivem Resultate zum Nachweis der Pankreasglykolyse benutzt.

Ich habe nun Untersuchungen nach folgenden Richtungen angestellt.

1. Über das Vorhandensein der Glykolyse im Organbrei bzw. im Organpreßsaft.

2. Über die Produkte der Glykolyse.

3. Über die Intensität der Glykolyse bei gewöhnlicher und anaerober Atmung.

4. Habe ich das glykolytische Ferment aus den Preßsäften zu isolieren versucht und seine zuckerzerstörende Kraft mit der der Preßsäfte verglichen.

5. Habe ich versucht, die bei der Glykolyse entstehenden Produkte quantitativ zu bestimmen, sowie das Verhältnis zwischen der gebildeten CO_2- und Alkoholmenge.

Zur Methodik.

1. Gewinnung des Organbreis. Die Organe stammten entweder von im Laboratorium getöteten Tieren oder vom Schlachthof. Sie wurden sofort nach dem Schlachten aus dem Tierkörper entnommen und im letzteren Falle während des Transportes in Toluolwasser bzw. Fluornatriumlösung gehalten. Vor dem Verarbeiten wurden sie 1 bis 3 Stunden im Eisschrank stehen gelassen, dann von Fett und Sehnen befreit, in einer Fleischmaschine fein zermahlen und durch einen reinen Leinwandlappen mittels einer starken Handpresse filtriert.

2. Zur Gewinnung des Preßsaftes wurden ebenfalls nur die Organe von frisch geschlachteten Tieren verwendet. Nach dem Abspülen mit dem Wasserstrahl und Befreien von Fett und Sehnen wurden die Organe mit der Fleischmaschine zerkleinert, mit Quarzsand vermischt und zerrieben, in mehrere Portionen verteilt und in der Buchnerschen Presse bei 300 Atm. Druck gepreßt. Der erhaltene Saft wurde in sterilen Kolben mit oder ohne Chloroform aufgefangen und 10 bis 14 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Der auf diese Weise gewonnene Saft stellt eine leicht trübe, mehr oder weniger bräunlich-rötliche Flüssigkeit dar, die mikroskopisch keine erhaltenen Gewebszellen zeigt. Aus 5 kg Substanz wurden etwa 500 bis 650 ccm Saft erhalten.

3. Um das Ferment zu isolieren, bediente ich mich des von Blumenthal angegebenen Verfahrens:

---

*) Šimáček, Centralbl. f. Physiol. **17**, Nr. 1, 1903.

200 bis 300 ccm Saft wurden in einem hohen Cylinder mit absolutem Alkohol übergossen und gut durchgeschüttelt. Nach dem Abscheiden des Niederschlages wurde der Alkohol abgegossen und der Niederschlag zweimal mit Äther durchgeschüttelt und mit der Wasserstrahlpumpe abfiltriert. Der erhaltene Niederschlag stellte eine graugelbliche zellenfreie Masse dar, die im Brutofen bei 30 bis 35° in kleinen Portionen auf Fließpapier etwa 10 bis 20 Minuten resp. im Vakuumapparat getrocknet wurde. Vor der Anstellung der Versuche wurde der trockene Niederschlag abgewogen und im sterilen Mörser mit etwas sterilem Wasser aufgeschwemmt.

4. Alle Versuche wurden unter Zusatz von Antisepticis, Chloroform bzw. Toluol, Fluornatrium oder Thymol ausgeführt.

Sämtliche Gefäße waren vor dem Gebrauche im Kochschen Apparat sterilisiert. Auch die verwandten Zuckerlösungen waren sterilisiert und behufs Konservierung mit Chloroform versetzt.

Bei der Unterbrechung der Versuche wurden stets von den Brei- bzw. Preßsaftzuckerlösungen 1 bis 2 Platinösen oder mittels steriler Pipette einige Tropfen auf Agar und Bouillon übertragen. Die Nährböden wurden im Brutofen bei entsprechender Temperatur, solange als der Hauptversuch dauerte, meist 4 × 24 Stunden, belassen. In den meisten Versuchen wurde auch die Züchtung anaerober Bakterien vorgenommen.

Um einen Einblick in die Produkte der Glykolyse zu gewinnen, habe ich mich folgenden Verfahrens bedient.

Zwei Halbliterflaschen werden mit durchbohrten Gummistöpseln geschlossen und untereinander durch ein gebogenes Glasrohr verbunden. In die eine Flasche kommt unter Zusatz des Antiseptikum das Brei- resp. Saftzuckergemisch, in die andere Baryt- bzw. Kalkwasser zur Aufnahme der sich entwickelnden Kohlensäure. Das Verbindungsrohr reicht in der Flasche mit dem Kalkwasser fast bis zum Boden des Gefäßes, in der Flasche mit dem Gemische etwas über den unteren Rand des Gummistöpsels.

Bei den anaerob angestellten Versuchen sind die Gummipfropfen doppelt durchbohrt: außer der Verbindungsröhre ist jeder Pfropfen noch mit einem gebogenen Glasrohr versehen, das an seinem freien Ende einen Gummischlauch mit Metallklemme trägt. In der Flasche mit dem Preßsaftzuckergemisch reicht das zweite Rohr fast bis zum Boden des Gefäßes, in der mit Kalkwasser einige Zentimeter über den unteren Rand des Pfropfens. Bei der Durchleitung des Wasserstoffs passiert das sich im Kippschen Apparat entwickelnde Gas zuerst eine Flasche mit 5proz. Sublimatlösung, dann eine Wulffsche Flasche mit konzentrierter Natronlauge, dann wieder eine Flasche mit Sublimatlösung, dann die Flasche mit dem Preßsaftzuckergemisch und schließlich die mit Kalkwasser. Dabei wird die Klemme an dem Ausgangsrohr der Kalkwasserflasche beim Beginnen der Durchleitung zunächst geöffnet und beim

Schlusse der Durchleitung zuerst geschlossen. In der III. Versuchsreihe (s. u.) habe ich mich genau der Anordnung bedient, wie sie von Stoklasa angegeben worden ist*).

Die quantitative Bestimmung des Kohlendioxyds habe ich in den meisten Versuchen nicht vorgenommen, da mich hauptsächlich die Produkte der Glykolyse interessierten; ich begnügte mich mit der Abschätzung der Menge des ausgefallenen kohlensauren Baryums bzw. Kalziums. Späterhin habe ich mich bemüht, auch das Verhältnis zwischen der bei der Glykolyse entstehenden Alkohol- und Kohlensäuremenge genauer zu bestimmen, und habe mich dabei der von Stoklasa gebrauchten Methodik bedient.

Die Bestimmung des Zuckers geschah stets (außer in einem Falle, wo ich mich des Polarisationsapparates bediente) nach dem Knappschen Titrationsverfahren. Diese Methode wurde zuerst auf ihre Genauigkeit geprüft und nach den dabei erhaltenen Resultaten für unsere Zwecke geeignet befunden.

Von den frisch zubereiteten, bzw. der Glykolyse unterworfenen Preßsaftzuckergemischen werden 30 ccm mit 1 bis 2 Tropfen Essigsäure angesäuert, im Wasserbade aufgekocht und nach dem Abkühlen abfiltriert. Das Koagulum wird sorgfältig mit destilliertem Wasser auf dem Filter ausgewaschen. Die Filtrate werden vereinigt und mit Wasser auf das ursprüngliche Flüssgikeitsquantum aufgefüllt. In der auf diese Weise enteiweißten Flüssigkeit wird der Zuckergehalt mit der Knappschen Lösung titriert. Die in den einzelnen Versuchen angegebenen Zuckerwerte sind das Mittel der bei zwei Titrationen desselben Gemisches erhaltenen Zahlen.

Was den Alkohol betrifft, so gelang es mir nicht, bei den einzelnen Versuchen ihn rein darzustellen. Deshalb habe ich bei jedem Versuche in geringen Mengen des erhaltenen Destillats die üblichen Alkoholproben, in den meisten Fällen auch die Natriumnitroprussidprobe, angestellt. Die Reste der Destillate wurden vereinigt, in einem sterilen geschlossenen Kolben aufbewahrt und der fraktionierten Destillation, wie unten beschrieben ist, unterworfen.

Bevor ich zu der Schilderung der einzelnen Versuche übergehe, möchte ich noch an dieser Stelle folgendes bemerken.

Ohne Zusatz von Antisepticis gelang es mir nicht, einen einzigen Versuch steril zu erhalten. Deshalb habe ich dieses Verfahren aufgegeben und bediente mich in allen hier angeführten Versuchen irgend eines von den früher angeführten Antisepticis. Auch bei Zusatz von Antisepticis gelang es mir

*) Stoklasa, Diese Beiträge 3, 464.

öfters nicht, die Gemische während der Versuchsdauer bakterienfrei zu erhalten.

Ich berichte in folgendem daher bloß über die Versuche, die bakterienfrei verliefen.

Versuchsreihe I.

Versuch Nr. 1.

Zwei Kaninchenlebern werden unter aseptischen Kautelen ausgeschnitten, in kochendes Wasser kurz eingetaucht, in steriler Petrischale fein zerschnitten.

A. Die eine Hälfte wird mit 50 ccm einer 10proz. Zuckerlösung unter Toluolzusatz im Überschuß versetzt und in eine Flasche getan. In der anderen Flasche Kalkwasser.

B. Die andere Hälfte wird zur Kontrolle anstatt mit Zuckerlösung mit steriler Kochsalzlösung und Toluol vermischt. Sonst wie in A.

C. 100 ccm von demselben Kalkwasser in geschlossener Flasche. Alles wird in den Brutschrank bei 37° gesetzt.

	A.	B.	C.
Nach 6 Stdn.	Sehr leichte Trübung	Sehr leichte Trübung	Sehr leichte Trübung
„ 18 „	Trübung stärker, geringer Niederschlag	Kalkwasser klar, kaum merkbarer Niederschlag	Kalkwasser klar, kaum merkbarer Niederschlag
„ 25 „	Kalkwasser trübe, Niederschlag etwas größer	Unverändert	Unverändert
„ 2 × 24 „	Geringe Gasentwickelg. Kalkwasser wie am Tage zuvor	Unverändert	Unverändert
„ 54 „	Keine Gasentwickelg. Kalkwasser trübe, Niederschlag größer	Unverändert	Unverändert
„ 3 × 24 „	Keine Gasentwickelg. Kalkwasser klar, Niederschlag wie am Tage zuvor, im ganzen nicht groß.	Unverändert.	Unverändert.

Am 4. Tage abgeimpft, abdestilliert; in den Destillaten:

	A.	B.
Die Jodoformprobe . .	deutlicher Geruch, einzelne Kristalle	negativ
Die Acetonprobe . . .	negativ	negativ

Nährböden blieben steril.

Versuch Nr. 2.

Drei unter aseptischen Kautelen ausgeschnittene Kaninchenlebern werden kurz in kochendes Wasser eingetaucht, fein zerschnitten, im sterilen Mörser zerrieben und durch einen Leinlappen unter Zusatz von 20 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung gepreßt. Erhalten: etwa 40 ccm dünnflüssigen Breis.

A. 20 ccm Brei werden mit 50 ccm steriler 5proz. Zuckerlösung und 10 ccm einer 1proz. Fluornatriumlösung vermischt, das Gemisch wird mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf 100 ccm aufgefüllt. In der anderen Flasche 100 ccm Kalkwasser.

B. Im Kontrollversuche hat das Gemisch die gleiche Zusammensetzung, der Brei aber ist vorher aufgekocht. Brutschrank bei 37°.

	A.	B.
Nach 6 Stdn.	Leichte Trübung	Sehr leichte Trübung
„ 22 „	Deutliche Trübung, geringer Bodensatz, Aufsteigen einzelner Gasbläschen im Kalkwasser	Kalkwasser klar, kaum merklicher Bodensatz
„ 30 „	Gasentwickelung gering, Bodensatz größer, Kalkwasser trübe.	Unverändert
„ 2×24 „	Keine Gasentwickelung mehr, Kalkwasser ziemlich klar, deutlicher Bodensatz	Unverändert
„ 3×24 „	Wie am Tage zuvor.	Unverändert
Am 4. Tage	Das Gemisch riecht und reagiert stark sauer. (Die Trommersche und Mooresche Probe stark positiv.) Im Destillate Jodoformprobe (starker Geruch, reichlich Kristalle) Acetonprobe negativ.	Das Gemisch reagiert schwach sauer. Jodoform- und Acetonprobe im Destillate negativ.

Die Nährböden blieben steril.

Versuchsreihe II.

Organpreßsäfte und aus ihnen durch Fällung mit Alkohol-Äther gewonnene Niederschläge.

Versuch Nr. 3.

A. Etwa 20 ccm Pferdeleberpreßsaft werden unter Zusatz von Chloroform mit 100 ccm einer 10proz. sterilen Traubenzuckerlösung in einer Flasche vermischt. In der anderen Flasche etwa 100 ccm Kalkwasser. Es wird täglich zwei Stunden lang Wasserstoff durchgeleitet.

B. 10 g aus dem Saft mit Alkohol-Äther gefällten Niederschlags + 100 ccm einer 10proz. Zuckerlösung + Chloroform. In der anderen Flasche 100 ccm Kalkwasser. Täglich wird zwei Stunden lang Wasserstoff durchgeleitet.

A.	B.
Bei der Durchleitung tritt eine Trübung des Kalkwassers ein, allmählich bildet sich ein bedeutender Niederschlag.	Das Kalkwasser wird bei der Durchleitung sofort getrübt, schon nach zehn Minuten bildet sich ein geringer Niederschlag, das Wasser ist stark trübe; zum Schluß der Durchleitung besteht eine starke Trübung des Kalkwassers und ein ziemlich starker Niederschlag.

Die Flaschen werden in den Brutofen bei 37° gesetzt.

	A.	B.
Nach $2^1/_2$ Stdn.	Das Kalkwasser trübe, der Niederschlag etwas größer, Aufsteigen einzelner Gasblasen aus der Verbindungsröhe im Kalkwasser.	Das Kalkwasser ist stark trübe, der Niederschlag ist größer wie in A, ziemlich starke Gasbildung; reichliches Aufsteigen von Gasblasen im Kalkwasser.
„ 6 „	Die Gasentwickelung etwas stärker, der Niederschlag größer, das Kalkwasser ist trübe.	Die Gasentwickelung wie vorher, der Niedercshlag ist noch größer geworden, das Kalkwasser ist stark trübe.
„ 24 „	Die Gasbildung geht langsam weiter vor sich.	Die Gasbildung ist bedeutend stärker wie in A, im Gemisch ist deutliche Gärung erkennbar.
„ 2 × 24 „	Gasbildung wie am Tage zuvor; der Niederschlag scheint nicht größer geworden zu sein, das Kalkwasser ist trübe.	Die Gasbildung und Gärung bestehen noch, sie haben aber an Intensität abgenommen, starker Niederschlag, das Kalkwasser leicht getrübt.
„ 3 × 24 „	Ganz geringe Gasentwickelung, das Kalkwasser leicht trübe, der Niederschlag wie am Tage zuvor.	Gasentwickelung u. Gärung haben aufgehört. Das Kalkwasser ist ziemlich klar, starker Niederschlag.
„ 4 × 24 „	Keine Gasentwickelung, das Kalkwasser ist klar, Bodensatz etwa $^1/_4$ cm hoch.	Keine Gasentwickelung und Gärung, Kalkwasser klar, Bodensatz zweimal so hoch wie in A.

Am fünften Tage wird von beiden Gemischen je eine Platinöse in Agar- und Bouillonröhrchen übertragen.

Beide Gemische riechen nach frischem Fleisch, Chloroform und stark sauer, beide reagieren stark sauer. Die angestellte Trommersche Probe fällt in beiden Gemischen stark positiv aus, die Mooresche Probe ist im Gemische A stärker wie im Gemische B. Die Gemische, sowie das Kalkwasser werden mit Natriumkarbonatlösung neutralisiert und ab-

destilliert. Die in den ersten Destillatportionen angestellten Proben fielen folgendermaßen aus:

Jodoformprobe, nach Zusatz von Jodkalium und Natronlauge:

A.	B.
Allmählich Trübung und deutlicher Jodoformgeruch, nach zwei Stunden scheiden sich mehrere Jodoformkristalle aus.	Allmählich entwickelt sich starke Trübung, starker Jodoformgeruch, reichlich Jodoformkristalle.
Aldehydprobe, nach Zusatz von Chromat und H_2SO_4:	
Deutliche Grünfärbung und Aldehydgeruch.	Starke Grünfärbung, starker Aldehydgeruch.
Natriumnitroprussidprobe negativ.	negativ.

Die Reste der Destillate werden zusammengegossen und für die spätere Reindarstellung des Alkohols in sterilem geschlossenen Kolben aufbewahrt.

Die Nährböden bleiben steril.

C. Zur Kontrolle wird durch 100 ccm desselben Kalkwassers zwei Stunden lang Wasserstoff durchgeleitet. Bei der Durchleitung wird die Flüssigkeit sehr leicht getrübt, beim Stehen im Brutofen scheidet sich ein kaum bemerkbarer Niederschlag ab, die übrige Flüssigkeit bleibt klar.

Versuch Nr. 4.

Zwei sterile Gärungsröhrchen werden mit einer Mischung aus fünf Teilen einer 10proz. Zuckerlösung und einem Teil Leberpreßsaft unter Chloroformzusatz gefüllt und in den Brutschrank gesetzt.

Nach $2^1/_2$	Stunden	ist in beiden Gärungsröhrchen keine Veränderung merkbar.
„ 6	„	Im oberen Teile des langen Schenkels sind einzelne kleine Gasbläschen.
„ 24	„	Die Zahl der Gasbläschen hat nicht zugenommen, das Gemisch sieht in einem Röhrchen etwas trübe aus.
„ 2 × 24	„	Beide Gemische sehen trübe aus, die Zahl der Gasbläschen hat nicht zugenommen.
„ 3 × 24	„	wie am Tage zuvor.

Am vierten Tage wird von beiden Gärungsröhrchen eine Platinöse auf Agar und Bouillon übertragen; nach zwölf Stunden deutliches Bakterienwachstum.

Versuch Nr. 5.

A. Drei sterile Gärungsröhrchen werden mit einer Mischung aus vier Teilen einer sterilen mit Chloroform gesättigten 10proz. Zuckerlösung gefüllt. In ein Röhrchen wird noch ein Tropfen Toluol, in das andere noch ein Tropfen Chloroform zugesetzt.

B. Drei Gärungsröhrchen werden mit einem Gemisch aus vier Teilen derselben Zuckerlösung und einem Teil aus dem Preßsaft gewonnenen Niederschlags gefüllt. Zusatz von Antiseptikum wie in A.

In sämtlichen Röhren tritt während 5 × 24 Stunden keine sichtbare Veränderung ein. Die Nährböden bleiben steril.

Versuch Nr. 6.

In diesem Versuch wird Leberpreßsaft und aus ihm gewonnener Niederschlag verwendet, die 36 Stunden unter Chloroformzusatz auf Eis

gestanden hatten. Versuchsanordnung wie im Versuch Nr. 3. Der Fermentniederschlag zeigt zwar auch hier eine größere glykolytische Kraft als der Preßsaft, aber im ganzen ist die Glykolyse bedeutend geringer als bei frischen Substanzen.

Bei der Wasserstoffdurchleitung trübt sich das Kalkwasser geringer wie im Versuche Nr. 7, die Gasentwickelung beginnt erst nach 24 Stunden und besteht nur etwa acht Stunden; die Jodoform- und Aldehydproben fallen schwach positiv aus.

Versuch Nr. 7.

30 ccm Leberpreßsaft + 100 ccm steriler 10 proz. Traubenzuckerlösung + 10 ccm Toluol werden in eine sterile Flasche getan. In der anderen Flasche 100 ccm Kalkwasser + 10 ccm Toluol. Es wird Wasserstoff eine Stunde lang durchgeleitet. Beim Durchleiten tritt eine sehr geringe Trübung des Kalkwassers ein. Nach sechsstündigem Stehen im Brutofen ist das Kalkwasser klar, es hat sich ein ganz geringer Niederschlag gebildet.

Vier Tage bleibt der Apparat im Brutschrank ohne weitere Veränderung. Am fünften Tage wird geöffnet; das Gemisch riecht stark nach Toluol und frischem Fleisch, reagiert schwach sauer. Die angelegten Nährböden bleiben steril.

Der Zuckergehalt vor dem Versuch — 8,3 Proz., nach dem Versuch — 8,1 Proz.

Die im Destillate angestellten Jodoform- und Aldehydproben, sowie die Natriumnitroprussidprobe fielen negativ aus.

Versuch Nr. 8.

A. Vier Gärungsröhrchen werden mit je 10 ccm einer 5 proz. Zuckerlösung (mit Chloroform gesättigt) und je 1 ccm Leberniederschlag gefüllt, als Antiseptikum werden je zwei Tropfen zugesetzt:

	Nach 2 × 24 Stunden,	nach 4 × 24 Stunden.
1. ohne Antiseptikumzusatz	$^1/_3$ Röhre ist mit Gas gefüllt, die Flüssigkeit ist klar	
2. Toluol	$^1/_{10}$ Röhre ist mit Gas gefüllt, die Flüssigkeit ist klar	Ohne Veränderung.
3. Chloroform 4. 10 proz. Fluornatriumlösung	Keine Gasentwickelung, die Flüssigkeit ist klar.	

Es wird auf Agar und Bouillon mittels Pipette je ein Tropfen übertragen, die Nährböden bleiben 4 × 24 Stunden steril.

Versuch Nr. 9.

A. 100 ccm Leberpreßsaft + 100 ccm steriler Zuckerlösung + 20 ccm einer 10 proz. Fluornatriumlösung . . . . 200 ccm Kalkwasser.

B. Von 100 ccm Leberpreßsaft durch Alkohol und Äther gewonnener Niederschlag + 100 ccm Zuckerlösung + 20 ccm einer 10 proz. Fluornatriumlösung . . . . 200 ccm Kalkwasser.

Es wird Wasserstoff zwei Stunden lang durchgeleitet. Die erste Trübung des Kalkwassers tritt in A etwa nach zehn Minuten, in B nach fünf Minuten ein. Zum Schluß ist das Kalkwasser in beiden Proben ziemlich gleich stark getrübt, der Niederschlag ist auch in beiden Flaschen ziemlich gleich.

	A.	B.
Nach 3 Stdn.	Unverändert	Unverändert
„ 6 „	Deutliche Gasentwickelung, Niederschlag größer	Unverändert
„ 9 „	Wie vorher	Ganz leichte Gasentwickelung
„ 22 „	Gasentwickelung stark, im Gemische deutliche Gärung, Kalkwasser stark trübe, Niederschlag bedeutend größer	Ziemlich starke Gasentwickelung, im Gemische leichte Gärung, Kalkwasser trübe, Niederschlag bedeutend größer
„ 2 × 24 „	Gasentwickelung ziemlich stark, leichte Gärung	Starke Gasentwickelung, starke Gärung
„ 3 × 24 „	Gasentwickelung gering, im Gemisch keine Gärung	Gasentwickelung gering, geringe Gärung
„ 4 × 24 „	Keine Gasentwickelung, Kalkwasser klar, Niederschlag etwa $^1/_2$ cm hoch	Sehr geringe Gasentwickelung, Kalkwasser ziemlich klar, Niederschlag etwas größer wie in A.
„ 5 × 24 „	Wie am Tage zuvor.	Keine Gasentwickelung, Kalkwasser klar, Niederschlag wie am Tage zuvor.

Das Stehen im Brutschrank unterbrochen.

Abgeimpft mittels steriler Pipette auf Agar und Bouillon. Beide Gemische riechen nach frischem Fleisch und sauer. Jedes Gemisch mit dem entsprechenden Kalkwasser vereinigt und abdestilliert. Die angestellten Proben auf Alkohol positiv, die Natriumnitroprussidprobe negativ.

Die Zuckerbestimmung ergibt:

	A.	B.
Vor dem Versuche	9,2 Proz. — 11,5 g	5,1 Proz. — 11,66 g
Nach „ „	5,3 „ — 6,63 „	2,8 „ — 6,16 „
Menge des vergor. Zuckers .	4,87 g	5,5 g.

Versuch Nr. 10.

A. Fünf Gramm Muskelpreßsaft, durch Alkohol und Äther gewonnener Niederschlag + 100 ccm Zuckerlösung + Chloroform. Versuch anaerob.

B. Wie A, Versuch aerob.

A. Bei der Durchleitung des Wasserstoffs tritt sofort Trübung ein, die rapid zunimmt, nach 15 Minuten Niederschlag. Zum Schluß der Durchleitung ist das Kalkwasser stark trübe; bedeutender Niederschlag.

B. Beim Stehen auf dem Tisch keine Trübung des Kalkwassers.

	A.	B.
Nach 3 Stdn.	Geringe Gasentwickelung	Unverändert
„ 8 „	Gasentwickelung etwas stärker, Niederschlag größer, Kalkwasser deutlich trübe	Leichte Gasentwickelung, das Kalkwasser ist trübe, Niederschlag geringer wie in A
„ 24 „	Gasentwickelung stark, Kalkwasser stark trübe, Niederschlag größer	Ziemlich starke Gasentwickelung, Kalkwasser stark trübe, Niederschlag wie in A
„ 28 „	Starke Gasentwickelung, im Gemisch deutliche Gärung	Starke Gasentwickelung, keine Gärung im Gemisch
„ 32 „	Wie vorher	Gasentwickelung wie vorher, geringe Gärung im Gemisch
„ 2 × 24 „	Gärung u. Gasentwickelung lassen nach	Wie am Tage zuvor.
„ 3 × 24 „	Keine Gärung, keine Gasentwickelung	Geringe Gasentwickelung, geringe Gärung
„ 4 × 24 „	Wie am Tage zuvor, Kalkwasser klar, etwa ein cm dicker Niederschlag.	Keine Gärung, keine Gasentwickelung, Kalkwasser klar, etwa 1 cm dicker Niederschlag.

Das Stehen im Brutschrank unterbrochen.

Von den Gemischen wird auf Agar und Bouillon je ein Tropfen mittels Pipette übertragen. Die Nährböden bleiben steril.

Die Gemische riechen nach frischem Fleisch, Toluol und sauer; reagieren stark sauer. In den Destillaten fallen die Alkoholproben positiv aus.

	A.	B.
Zuckergehalt vor dem Versuche . . .	8,2 Proz.	8,2 Proz.
„ nach „ „ . . .	5,4 „	5,8 „

Bei diesen Versuchen wird die gesamte Azidität vor und nach dem Stehen im Brutschrank bestimmt. Zu diesem Zwecke wird das Gemisch abfiltriert, und 10 ccm des Filtrats werden unter Zusatz von einigen Tropfen neutraler Lakmuslösung mit $^1/_{10}$ Normalnatronlösung titriert. Azidität auf 100 berechnet beträgt:

	A.	B.
Azidität vor dem Versuche	8	9
„ nach „ „	31	28

Versuch Nr. 11.

Aus etwa 250 g Leber von einem Diabetiker werden drei Stunden nach dem Tode mit der Buchnerschen Presse etwa 50 ccm roter Flüssigkeit gewonnen (die Preßtücher sind mit steriler NaCl-Lösung angefeuchtet). Der Lebersaft wird mit 75 ccm Zuckerlösung unter Zusatz von Chloroform vermischt und in eine Flasche getan. In der anderen Flasche Kalkwasser. Es wird eine Stunde lang Wasserstoff durchgeleitet; dabei entsteht eine geringe Trübung, sowie ein ganz leichter Niederschlag.

Nach 6 Stunden Kalkwasser klar, geringer Niederschlag
„ 24 „ wie am Tage zuvor
„ 2 × 24 „ unverändert
„ 3 × 24 „ ebenfalls.

Am vierten Tage riecht das Gemisch nach Chloroform und sauer. Die am Destillate angestellten Alkoholproben fallen negativ aus.

Zuckergehalt vor dem Versuche . . . . 4,9 Proz.
„ nach „ „ . . . . 4,7 „

Versuch Nr. 12.

A. 100 ccm Muskelpreßsaft + 100 ccm Traubenzuckerlösung + Toluol im Überschuß.

B. Niederschlag gewonnen aus 100 ccm Muskelpreßsaft und + 100 ccm Traubenzuckerlösung + Toluol im Überschuß.

Beide Versuche anaerob.

Bei der Durchleitung des Wasserstoffs tritt Trübung in beiden Versuchen fast zur gleichen Zeit ein, zum Schluß aber ist in B ein etwas größerer Niederschlag wie in A.

Brutschrank bei 37°.

	A.	B.
Nach 3 Stdn.	Trübung und Niederschlag etwas größer	Wie in A
„ 6 „	Wie vorher	Leichte Gasentwickelung, Niederschlag größer, Kalkwasser deutlich trübe
„ 10 „	Leichte Gasentwickelung	Gasentwickelung stärker
„ 24 „	Leichte Gärung, Gasentwickelung stark	Gasentwickelung stark. Im Gemische deutl. Gärung.
„ 30 „	Wie vorher	Wie vorher
„ 2 × 24 „	Ziemlich starke Gasentwickelung und Gärung	Gasentwickelung ziemlich stark, Gärung gering
„ 3 × 24 „	Geringe Gasentwickelung und Gärung	Geringe Gasentwickelung, keine Gärung
„ 4 × 24 „	Keine Gasentwickelung, keine Gärung, Kalkwasser klar, starker, 1 cm hoher Niederschlag.	Wie in A.

Abgeimpft mit steriler Pipette auf Agar und Bouillon. Die Nährböden bleiben steril. Die Gemische riechen nach frischem Fleisch, Toluol und sauer, reagieren stark sauer. Die auf Alkohol angestellten Proben fallen positiv aus. Die Zuckerbestimmung ergibt:

	A.	B.
Vor dem Versuche . . .	4,6 Proz. — 9,2 g	8,9 Proz. — 10,68 g
Nach „ „ . . .	2,8 „ — 5,6 g	6,3 „ — 7,65 g
Menge des vergor. Zuckers	3,6 g	3,03 g

	A.	B.
Azidität vor dem Versuche	—	4
„ nach „ „	—	39

Versuch Nr. 13.

Ein Kaninchen wird getötet. Die ganze Muskulatur abpräpariert, sorgfältig mit sterilem Wasser abgespült, in einer Fleischhackmaschine zerkleinert, mit Quarzsand zerrieben und nachher gepreßt. Erhalten werden etwa 180 ccm hellbräunlicher Saft. Im Eisschrank zwei Stunden. Die Hälfte wird schnell mit Alkohol und Äther auf Ferment verarbeitet.

A. Etwa 90 ccm Kaninchenfleischpreßsaft + 100 ccm Zuckerlösung + Toluol im Überschuß.

B. Niederschlag, erhalten aus 90 ccm Kaninchenpreßsaft, + 100 ccm Zuckerlösung + Toluol im Überschuß. Versuchsanordnung anaerob.

Bei der Durchleitung stellt sich die Trübung und der Niederschlag in beiden Versuchen fast zur gleichen Zeit und in gleicher Intensität ein.

	A.	B.
Nach 3 Stdn.	Trübung und Niederschlag etwas größer, keine Gasbildung	Aufsteigen einzelner Blasen in das Kalkwasser, letzteres trübe, Niederschlag wie in A
„ 5 „	Geringe Gasentwickelung	Gasentwickelung stärker wie in A
„ 24 „	Gasentwickelung stärker als am Tage zuvor	Gasentwickelung ziemlich stark
„ 30 „	Starke Gasentwickelung, starker Niederschlag	Wie in A
„ 2 × 24 „	Wie am Tage zuvor	Wie in A.
„ 3 × 24 „	Gasentwickelung läßt nach	Gasentwickelung etwas stärker wie in A
„ 4 × 24 „	Keine Gasentwickelung, Kalkwasser klar, Niederschlag etwa 1/2 cm dick.	Keine Gasentwickelung, Kalkwasser leicht trübe, Niederschlag wie in A.

Mittels steriler Pipette wird von jedem Gemisch je ein Tropfen auf Bouillon und Agar übertragen. Die Nährböden bleiben steril.

Die Gemische riechen nach frischem Fleisch, Toluol und sauer; reagieren stark sauer.

In den Destillaten fallen die Alkoholproben positiv aus, die Acetonprobe negativ.

Der Zuckergehalt beträgt:

	A.		B.	
Vor dem Versuche	2,8 Proz.	— 5,6 g	5,3 Proz.	— 5,3 g
Nach „ „	1,6 „	— 3,2 „	2,9 „	— 2,9 „
Die Menge des vergor. Zuckers	2,4 g		2,4 g.	

Reindarstellung des Alkohols.

Die von den meisten Versuchen dieser Reihe in steriler geschlossener Flasche unter Zusatz von Toluol aufbewahrten Destillatreste, im ganzen in der Menge von etwa 120 ccm, werden von Toluol befreit und auf die Hälfte abdestilliert. Das erhaltene Destillat wird mit Natriumkarbonat gesättigt. Beim Zusatz von Natriumkarbonat tritt starker Alkoholgeruch auf, allmählich bildet

sich an der Oberfläche eine fette, stark nach Alkohol riechende Schicht. Die mit Natriumkarbonat gesättigte Flüssigkeit wird wieder destilliert. Dabei werden 4 ccm Alkohol von 80 Proz. gewonnen. Der Siedepunkt des Alkohols war 78 bis 79°.

Versuchsreihe III.

Versuche mit der Anordnung von Stoklasa.

Um genauer auf das Verhältnis zwischen dem sich bei der Glykolyse entwickelnden Kohlendioxyd und Alkohol einzugehen und nachzuprüfen, ob die Glykolyse wirklich in der Art einer alkoholischen Gärung verläuft, habe ich mich bei den folgenden Versuchen genau der Anordnung und der Methodik bedient, wie sie von Stoklasa angegeben ist. Sämtliche Versuche dieser Reihe sind bei der Temperatur von 22° unter Zusatz von Antisepticis durchgeführt. Nach dem Ablauf jedes Versuches wurde auf aerobe, sowie auf anaerobe Bakterien untersucht.

Versuch Nr. 14.

1 kg Kaninchenfleisch wird $^1/_4$ Stunde in einer 0,5proz. Sublimatlösung sterilisiert, mit destilliertem Wasser tüchtig abgespült, in einem Mörser mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben und in der Buchnerschen Presse gepreßt. Erhalten werden etwa 220 ccm zellenfreien Saftes.

200 ccm davon werden mit 300 ccm einer 5proz. sterilen Traubenzuckerlösung versetzt; als Antiseptikum dient Thymol (drei Körnchen). Wasserstoff wird täglich zwei Stunden lang durchgeleitet. Während der ersten Durchleitung und eine Stunde nachher tritt keine bemerkbare Gärung ein.

Nach 18 Stunden keine Gärung zu sehen
„ 2 × 24 „ deutliche Gärung
„ 3 × 24 „ starke Gärung, über dem Gemisch steht eine Schaumschicht
„ 4 × 24 „ die Gärung hat aufgehört.

An Kohlendioxyd wurde gewonnen:

Nach 18 Stunden:	0,034
„ 2 × 24 „	0,458
„ 3 × 24 „	0,372
„ 4 × 24 „	0,080
im ganzen	0,944 CO_2.

In den für aerobe Bakterien angelegten Nährböden ist schon nach zwölf Stunden deutliches Bakterienwachstum nachweisbar. Die Nährböden für anaerobe Bakterien bleiben steril.

Alkohol durch fraktionierte Destillation darzustellen, gelang nicht, obwohl die qualitativen Proben auf Alkohol positiv ausfielen; die Natriumnitroprussidprobe war negativ.

Versuch Nr. 15.

In diesem Versuche wurde der durch Alkoholätherfällung aus Kaninchenfleischpreßsaft gewonnene Niederschlag benutzt.

6 g Niederschlag werden mit 100 ccm einer 5proz. sterilen Glykoselösung vermischt. Darüber wird etwas gepulvertes Thymol verstreut. Es tritt nach einer halben Stunde deutliche Gärung ein. Der Versuch bleibt wegen eines Unfalls unvollendet.

Versuch Nr. 16.

Aus 2 kg Schweinsleber wird Preßsaft in der Menge von 280 ccm gewonnen.

10 g des durch Alkoholätherfällung erhaltenen Niederschlages werden in 200 ccm einer sterilen 5proz. Traubenzuckerlösung getan; darüber wird reichlich Thymolpulver gestreut. Es tritt schon nach fünf Minuten eine lebhafte Gärung ein. Wasserstoff wird täglich zwei Stunden lang durchgeleitet.

Nach 24 Stunden:	Über dem Gemisch steht eine starke Schaumschicht
„ 2 × 24 „	Die Gärung scheint nachgelassen zu haben
„ 3 × 24 „	Keine sichtbare Gärung.

An Kohlendioxyd wurde gewonnen:

Nach 24 Stunden:	0,498
„ 2 × 24 „	0,364
„ 3 × 24 „	0,052
„ 4 × 24 „	0,013
Im ganzen	0,927 CO_2.

Die Alkoholproben fielen positiv aus. Eine Reindarstellung des Alkohols durch fraktionierte Destillation gelang aber nicht.

Die geimpften Nährböden blieben steril.

Versuch Nr. 17.

Schweinsleber im Gewichte von $2^1/_2$ kg. Erhalten werden etwa 350 ccm Preßsaft.

250 ccm Preßsaft werden mit 250 ccm einer 5proz. Zuckerlösung vermischt. Als Antiseptikum wird reichlich Thymolpulver zugesetzt. Wasserstoffdurchleitung täglich zwei Stunden. Nach acht Stunden tritt eine starke Gärung ein.

An Kohlendioxyd wurde erhalten:

Nach 24 Stunden:	0,346
„ 2 × 24 „	0,821
„ 3 × 24 „	0,793
„ 4 × 24 „	0,485
Im ganzen	2,445 CO_2.

Die Alkoholproben fielen folgendermaßen aus:

Jodoformprobe: Schwacher Geruch, wenige Kristalle

Aldehydprobe: Deutliche Grünfärbung, deutlicher Aldehydgeruch.

Eine Reindarstellung des Alkohols gelang nicht. In den angelegten Nährböden trat nach zwölf Stunden reichliches Bakterienwachstum ein.

Versuch Nr. 18.

250 ccm aus $2^1/_2$ kg Schweinsleber gewonnenen Preßsaftes werden mit 250 ccm einer 5proz. Traubenzuckerlösung vermischt. Als Antisepticum dienten 5 ccm Chloroform und etwas Thymolpulver.

An Kohlendioxyd erhalten:

Nach 12 Stunden:		0,27
„ 24	„	0,14
„ 2 × 24	„	0,06
„ 3 × 24	„	0,04
Im ganzen		0,51 CO_2.

Die qualitativen Alkoholproben fielen positiv aus. Die quantitative Bestimmung des Alkohols wurde durch Abwägung der ausgeschiedenen Jodoformkristalle vorgenommen; zur Bestimmung des eventuell vorhandenen Acetons habe ich mich des von C. Oppenheimer modifizierten Denigésschen Verfahrens*) bedient.

Auf diese Weise erhielt ich 6 mg Jodoform aus einer Substanz, die keineswegs Aceton war.

Die angelegten Nährböden blieben steril.

Wenn ich die Ergebnisse meiner Untersuchungen betrachte, so komme ich zu folgenden Resultaten:

1. In den unter Zusatz von Antisepticis angestellten Versuchen zeigte sich, wenn ich nur die anführe, in welchen die Abimpfung ergab, daß sich keine Bakterien entwickelt hatten, jedesmal die Bildung von Kohlendioxyd, Alkohol und Säuren.

Die Entwickelung der Kohlensäure und Zerstörung des Zuckers war stärker in den durch Alkoholäther erhaltenen Fällungen der Preßsäfte als in den Preßsäften selbst.

Auch negative Resultate mit Preßsäften hatte ich zu verzeichnen, immer dann, wenn ich sehr große Mengen Antiseptica zugesetzt hatte. Es ist also unbedingt nötig, bei der Anstellung solcher Versuche die Menge des Zusatzes von Antisepticis zu variieren, da schon ein geringes Minus die Bakterien nicht abtötet, ein geringes Plus die Wirkung des Fermentes hindern kann, eine Beobachtung, auf die schon verschiedene Autoren aufmerksam machten. Ich möchte noch erwähnen, daß auch die Buchnersche Zymase sich bei weitem nicht indifferent zu den verschiedenen Antisepticis und besonders zu verschiedenen Quantitäten desselben Antisepticums verhält**).

2. Die Glykolyse ist ein selbständiger zellulärer Vorgang, der anscheinend mehreren Organen zukommt. Ich fand sie in Brei- und Preßsäften von Pankreas***), Leber- und Muskelfleisch. Sie ist aber nicht bloß an die Tätigkeit der lebendigen Zelle gebunden, da der

---

*) C. Oppenheimer, Über einen bequemen Nachweis von Aceton usw. Berl. klin. Wochenschr. Nr. 38, 1899.

**) Buchner, E. u. H., und Hahn, M.: Die Zymasegärung 1903, Kapitel 4, S. 169.

***) Da von anderer Seite neuerdings negative Resultate mit Pankreas erzielt wurden, so sollen diese Versuche fortgesetzt werden, um die Divergenz der Ergebnisse aufzuklären.

durch hohen Druck in der Buchnerschen Presse gewonnene Saft, der bloß Zellentrümmer und keine lebendigen Zellen mehr enthält, bei gewöhnlicher, sowie bei anaerober Atmung glykolytisch wirkt.

Es ist mir auch gelungen, wie Blumenthal und Stoklasa und Czerny, das Ferment mit Alkoholäther, allerdings noch unrein, zu isolieren.

3. Aus dem Vergleich der aerob und anaerob ausgeführten Versuche (Nr. 11, 13, 17, 18) geht hervor, daß anaerob die Glykolyse intensiver und rascher vor sich geht als bei Sauerstoffzutritt.

4. Die glykolytische Kraft der Preßsäfte nimmt mit der Zeit ab, wie aus dem Versuche Nr. 6 hervorgeht.

5. Beim Vergleiche der Wirkung einer bestimmten Menge Preßsaftes mit der einer entsprechenden Quantität isolierten Fermentes (Nr. 9, 12, 13) stellt sich heraus, daß im Fermentzuckergemisch die Spaltung früher beginnt, früher zu Ende kommt und intensiver verläuft. Ich habe eine sehr rasch entstehende Gärung, wie sie Stoklasa beschreibt, bloß in drei Fällen auftreten gesehen; gewöhnlich trat sie erst nach 2½ bis 6 Stunden ein.

6. Unter den Produkten, die sich bei der Glykolyse entwickeln, konnte ich reichliche Mengen von Kohlendioxyd und verhältnismäßig sehr geringe Quantitäten von Alkohol konstatieren. Für die Bildung von Alkohol bei der Organglykolyse halte ich für beweisend: 1. das fast in allen Versuchen positiv ausgefallene Resultat der Alkoholreaktionen, wobei ausgeschlossen war, daß sie etwa durch Aceton vorgetäuscht sein könnten; 2. die gelungene Darstellung von fast reinem Alkohol, wenngleich nur in geringerer Menge (4 ccm). Doch muß die Menge des bei meinen Versuchen wirklich gebildeten Alkohols mindestens auf das doppelte Quantum geschätzt werden, da ich für die Alkoholreaktionen wenigstens die Hälfte der Destillate verbraucht habe.

7. Außer den genannten Produkten bilden sich bei der Glykolyse in reichlichen Mengen Säuren. Nach der abgelaufenen Glykolyse fand ich stets die Gemische bedeutend saurer wie vorher. In einigen Versuchen habe ich die Steigerung des Säuregrades in den Gemischen bei der Glykolyse zahlenmäßig auszudrücken versucht. Auf die Natur der Säuren bin ich nicht weiter eingegangen. Möglicherweise stören die sich entwickelnden Säuren die weitere zuckerzerstörende Wirkung des Fermentes. Claude Bernard*) hat schon die Beobachtung gemacht, daß Säuren die glykolytische Wirkung im Blut ver-

*) Claude Bernard, loc. cit.

hindern oder mindestens verzögern, und Bendix*) hat gefunden, daß, wenn die Säuren, noch ehe sie das Ferment abgetötet haben, durch Zusatz von Alkali neutralisiert werden, die Gärung ihren Fortgang nimmt. Šimáček berichtet in seiner eben erschienenen Arbeit, daß bei der Glykolyse außer Produkten der alkoholischen Gärung noch Milch- und Buttersäure entsteht.

8. Der Versuch Nr. 11 bestätigt die Befunde von M. Jacoby**) und Blumenthal***), daß die diabetische Leber keine glykolytische Kraft besitzt.

Die Mengen Alkohol, welche ich in den einzelnen Versuchen gefunden habe, waren viel zu gering, als daß man von einer alkoholischen Gärung sprechen könnte. Die wesentlichen Produkte bleiben immer Kohlendioxyd und Säuren. Die Glykolyse ist also, entsprechend der Ansicht von Blumenthal, ein selbständiger Vorgang, verursacht durch ein in den Gewebszellen enthaltenes Ferment, das aber nicht in gleicher Weise den Zucker abbaut wie das Hefeferment.

Zum Schluß möchte ich Herrn Geheimrat E. von Leyden meinen herzlichsten Dank aussprechen für die Erlaubnis, meine Arbeit auf seiner Klinik ausführen zu dürfen. Ebenso bin ich Herrn Dr. F. Blumenthal, Vorsteher des Laboratoriums der Klinik, für die Anregung und unermüdliche Unterstützung bei dieser Arbeit zu verbindlichstem Dank verpflichtet.

---

*) Bendix, loc. cit. Vgl. auch Burghart, Dtsch. med. Wochenschr. Nr. 37, 1899.

**) M. Jacoby, Kongress f. innere Medizin 1898.

***) Blumenthal, loc. cit.

XL.

Über die glykolytische Wirkung der Leber.*)

Von Dr. **Rahel Hirsch.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Bekanntlich sucht man die Ursache der diabetischen Stoffwechselstörung in einem Minderverbrauch von Zucker. Da nun die Exstirpation des Pankreas die gleiche Stoffwechselstörung hervorruft, so hat man diese Ursache in einer glykolytischen Wirkung des Pankreas gesucht (Lépine, Ferdinand Blumenthal), eine Vermutung, die sich in dieser Form als unrichtig erwiesen hat. Denn nicht bloß, daß das Pankreas an sich keine glykolytische Wirkung hat, auch das Blut der Vena pancreatico-duodenalis zeigt keine stärkere Glykolyse als jenes anderer Körpervenen (Umber).

Wohl war aber denkbar, daß das vom Pankreas zur Pfortader strömende Blut ein Agens, ein Proferment oder eine Kinase, der Leber zuführte, durch welche das Lebergewebe erst zum Zuckerverbrauch befähigt würde. Trifft diese Vorstellung zu, so muß die Pankreasexstirpation die sonst in der Leber erfolgende Umwandlung des Zuckers, die zu seinem Verschwinden führt, tief-

---

*) Vorliegende Untersuchung wurde Ende Juli lauf. Js. der hiesigen medizinischen Fakultät als Dissertation vorgelegt und erschien im August unter dem Titel: „Ein Beitrag zur Glykolyse". (Straßburg, Buchdruckerei C. Müh u. Co. 1903.) Die inzwischen veröffentlichte Untersuchung von O. Cohnheim: „Die Kohlehydratverbrennung in den Muskeln und ihre Beeinflussung durch das Pankreas" (Zeitschrift f. physiologische Chemie **39**, 336, ausgeg. am 3. Sept.) hat mit meiner Arbeit soviel Berührungspunkte, daß es notwendig erscheint, den wesentlichen Inhalt der Dissertation schon jetzt weiteren Kreisen zugänglich zu machen. Damit soll zugleich dem hiesigen Laboratorium das Recht gewahrt werden, die in Angriff genommene Frage weiter zu verfolgen.

Betreffs der Literatur der Glykolyse verweise ich auf meine Dissertation, sowie die in diesen Beiträgen erschienenen Arbeiten von Herzog (**2**, 102) und Feinschmidt (**4**, 511).

gehend schädigen oder völlig aufheben und muß so Hyperglykämie, Glykosurie und eine mehr oder weniger weitgehende Unfähigkeit, Zucker zu assimilieren, bedingen. Dieser Gedankengang, welcher von Herrn Professor Hofmeister gelegentlich seiner Vorlesungen entwickelt wurde, war der Ausgangspunkt der mitzuteilenden Versuche.

Sie hatten zum Ziele, festzustellen:

1. ob die von früheren Autoren bei Autolyse der Leber beobachtete Glykolyse sich auch auf zugesetzten Traubenzucker erstreckt;

2. ob in diesem Fall die Menge der bei der Autolyse entstehenden ätherlöslichen Fettsäuren, vor allem der Milchsäure, dadurch eine solche Steigerung erfährt, daß sich ein Schluß daraus auf die Entstehung dieser Säuren aus Zucker ziehen ließe;

3. ob die glykolytische Leistung der Leber durch Zusatz von Pankreas eine Steigerung erfährt.

Methodisches.

Die Versuche wurden ausschließlich an ganz frisch entnommenen Organen vom Rind unter strenger Antisepsis bzw. unter Anwendung von Toluol ausgeführt. Dies empfiehlt sich schon im Hinblick auf die zahlreichen Fehlerquellen, denen man bei rein aseptischen Versuchen, sobald es sich um Entnahme größerer Organe handelt, stets ausgesetzt ist. Im vorliegenden Falle, wo überdies eine möglichst innige Einwirkung der Leber auf den zugesetzten Zucker angestrebt werden mußte, war eine Zerkleinerung der Leber bzw. des Pankreas vor dem Zusammenbringen mit Zucker nicht zu umgehen, und dabei ist an eine Fernhaltung von Gärungs- und Fäulniserregern nicht zu denken. Da, wie andere Antiseptica, auch das Toluol bestimmte fermentative Umsetzungen aufheben kann, ist damit zugleich ein Verzicht auf den Nachweis von etwa vorhandenen gegen Toluol empfindlichen Fermenten gegeben*).

*) Wenn, während diese Untersuchungen ausgeführt wurden, Stoklasa und seine Schüler Beobachtungen mitgeteilt haben, wonach Leber und Pankreas und andere Organe der Hefezymase und dem Milchsäureferment ähnliche, äußerst wirksame Enzyme enthalten sollen, so konnte ich zu diesen Befunden in meinen Versuchen nicht weiter Stellung nehmen, möchte aber doch erwähnen, daß die von Stoklasa angewandten Maßnahmen, durch welche er sich vor Täuschung durch hinzutretende Gärungserreger zu schützen suchte, nicht derart sind, eine exakte Nachprüfung überflüssig zu machen. Vor allem ist die Unmöglichkeit, Bakterienwachstum durch Überimpfung auf eine beschränkte Anzahl Nährböden zu erzielen, keineswegs ein sicherer Beweis von Sterilität, da es zahlreiche, zumal anaërobe, Bakterien gibt, — man denke nur an die im Darm lebenden zahlreichen Formen —, die sich nur äußerst schwierig, wenn überhaupt, auf künstlichem Nährmaterial zu lebhaftem Wachsen bringen lassen. Soweit aber Stoklasa vom Zusatz antiseptischer Stoffe Gebrauch machte, so handelte es sich einerseits mehr-

Meine Versuche wurden in der Regel in folgender Weise ausgeführt. Von dem gut zerkleinerten Leber- bzw. Pankreasbrei wurden gewogene Mengen — 100 g — mit dem gleichen Gewicht 0,8 proz. Kochsalzlösung, event. einer Zuckerlösung von bekanntem Gehalt und soviel Toluol versetzt, daß der in einem gut verschließbaren Präparatenglas befindliche Brei nach innigem Schütteln beim Stehen eine fingerdicke Schicht von Toluol absetzte. Dieses Schütteln ist namentlich im Anfang zweckmäßig öfters zu wiederholen. Bei sehr fäulnisfähigen Geweben, z. B. Pankreas, kann man die Erfahrung machen, daß bei Unterlassen zureichenden Schüttelns sich Fäulnis auch unter der Toluolschichte einstellen kann. Daß in meinen Versuchen die Antisepsis eine vollkommene war, ergab sich nicht bloß aus der Beschaffenheit der Proben, die ihr frisches Aussehen lange bewahrten, sondern auch aus der mikroskopischen und bakteriologischen Prüfung. Insbesondere bin ich Herrn Prof. Forster für die gütige eingehende Untersuchung zweier derart gewonnener autolytischer Flüssigkeiten zu besonderem Danke verpflichtet, bei der sich deren völlige Sterilität auch auf den geeignetsten Nährböden herausstellte.

Die zur Autolyse bestimmten Proben wurden, gut verschlossen, in einen auf 37° temperierten Brutraum gestellt und gelangten nach einem kürzeren oder längeren Zeitraum (1 bis 100 Tage) zur Untersuchung. Dieselbe erstreckte sich auf die quantitative Bestimmung des Glykogens, des Zuckers und der ätherlöslichen Säuren.

Zur Bestimmung des Glykogens diente das in jüngster Zeit angegebene Verfahren von Pflüger, bei dem das Gewebe mit 60 proz. KOH-Lauge in Lösung gebracht und das Glykogen durch Alkohol ausgefällt wird. Die Prüfung auf Glykogen war übrigens nur bei der frischen oder nur wenige Tage autolysierten Leber notwendig, nach achttägiger Autolyse ist nie Glykogen mehr vorhanden, wie sich übrigens schon durch die völlig klare Beschaffenheit der Leberdekokte verrät. Behufs Zuckerbestimmung wurde der Organbrei in mit saurem Kaliumphosphat (KH_2PO_4) angesäuertem Wasser zum Kochen gebracht, wobei sich in der Regel das noch etwa vorhandene gelöste Eiweiß gut abschied; Flüssigkeit samt Niederschlag wurden dann in einem Maßzylinder auf ein bestimmtes Volum (1000 ccm) gebracht. Dann wurde nach längerem Stehen abfiltriert und ein aliquoter Teil unter Vernachlässigung des Volumens des Gewebes zur Zuckerbestimmung benützt. Gelegentliche Kontrollversuche im hiesigen Institut haben nämlich gezeigt, daß auf diesem bequemen Wege richtigere Zahlen für den Gehalt des Organbreis an gut diffundierenden Substanzen erhalten werden als bei Auswaschen des Eiweiß-Niederschlags. Sämtliche Titrationen wurden doppelt und zum Teil öfters ausgeführt.

Die Bestimmung der ätherlöslichen Säuren geschah durch Extraktion eines aliquoten Teiles des Dekokts nach Ansäuren mit Äther in einem Apparat nach Schacherl und darauf folgende Titration des sauren Ätherrückstandes.

---

fach um Stoffe von sehr unzureichender antiseptischer Wirkung, andererseits vielfach um den Zusatz von so kleinen Mengen und unter so ungünstigen Bedingungen, daß Zweifel an ihrer ausreichenden Wirksamkeit nicht ausgeschlossen sind.

Versuche.

Eine Anzahl der im Beginn von mir ausgeführten Versuche diente mir zur Orientierung über Technik und Fehlerquellen des angewandten Verfahrens. Diese Vorversuche hatten im ganzen das gleiche Ergebnis wie die noch anzuführenden; sie zeigten, daß unter Toluol eine langsame, aber unzweifelhafte Abnahme des der Leber zugefügten Zuckers erfolgt, sowie daß diese Abnahme durch Zusatz von Pankreasbrei in auffälliger Weise beschleunigt wird. Bei diesen Vorversuchen wurde ferner untersucht, ob der Zusatz von säurebindenden Salzen: Natriumbikarbonat, Magnesiumkarbonat, Kalziumkarbonat die Zuckerabnahme und die Säurebildung begünstigt. Doch habe ich in weiteren Versuchen, um nicht die natürlich gegebenen Bedingungen unnötig zu komplizieren, zumeist von diesen Zusätzen Abstand genommen.

Nachstehend lasse ich eine Anzahl Versuchsprotokolle in tabellarischer Anordnung folgen.

Tabelle I.

Versuche ohne Pankreaszusatz.

Nr. des Vers.	100 g frische Leber enthalten		Zusatz an Glykose g	Ges.-Kohlehydrat vor der Autolyse g	$NaHCO_3$	Dauer der Autolyse	Ges.-Kohlehydrat nach d. Autolyse g	Abnahme	
	Glykogen g	Glykose g						g	Proz.
IIb	1,34	2,86	0	4,20	0	4 Tage	4,20	0	0
IIIb	1,23	1,11	0	2,34	0	8 „	1,28	**1,06**	**45.3**
Ib	1,12	2,97	0	4,09	0	15 „	1,86	**2,23**	**54,5**
Ic	„	„	25,00	29,09	0	15 „	22,22	**6,87**	**23,6**
VI	0,67	2,45	24,50	27,62	zugesetzt	6 Wochen	21,92	**5,70**	**20,6**
IVb	0,39	1,95	0	2,34	0	3¼ Mon.	2,05	**0,29**	**12,6**
IVc	„	„	22,30	24,64	0	„ „	10,22	**5,42**	**22,0**
Vb	0,963	2,843	0	3,81	0	5 Mon.	2,94	**0,87**	**22,8**
Vc	„	„	0	„	zugesetzt	„ „	3,33	**0,48**	**12,5**
Vd	„	„	9,84	13,65	0	„ „	10,50	**3,15**	**23,1**
Ve	„	„	19,80	23,61	zugesetzt	„ „	17,02	**6,59**	**27,9**

Diese Versuche zeigen, daß Leberbrei unter Toluol, sich selbst überlassen, in vielen Fällen einen Zuckerverlust zeigt, der nach Zuckerzusatz pro 100 g Leber mehrere Gramm Zucker betragen kann.

Sie zeigen ferner, daß zugesetzter Traubenzucker stets angegriffen wird, und zwar im Verhältnis rascher als der von der

Leber gelieferte. Die Abnahme tritt verhältnismäßig langsam ein und erreicht selbst bei monatelanger Digestion meist nur einen Wert von 20 bis 30 Proz., selten bis 50 Proz. des ursprünglichen Kohlehydratgehalts. Dabei steigt die Menge des verschwundenen Zuckers deutlich mit der Größe des Zusatzes (Versuch V b, d, e). Die Abnahme kann daher bei sehr ungleichem Gehalt an Gesamtkohlehydrat prozentisch ziemlich gleich, in absoluten Werten aber sehr verschieden sein. Es könnte sich somit um eine Gleichgewichtsreaktion handeln.

Bevor ich daran ging, den Einfluß des Zusatzes von Pankreas auf die glykolytische Leistung der Leber zu bestimmen, war zu erwägen, ob nicht Pankreas selbst zuckerzerstörend wirkt. Von Lépine und Blumenthal und erst jüngster Zeit von Šimáček ist dem Pankreas eine solche Wirkung zugeschrieben, von Umber aber auf Grund sorgfältiger Versuche durchaus abgesprochen worden. Soweit es sich um Versuche mit ausreichender Antisepsis handelt — also um Bedingungen, wie sie auch bei meiner Untersuchung gegeben waren —, ist die Angabe Umbers nicht bezweifelt worden. Immerhin habe ich es für zweckmäßig gehalten, mich neuerdings von ihrer Richtigkeit zu überzeugen*).

Versuch VII.

100 g Pankreasbrei wurden mit 25 g Glykose unter Toluol sieben Tage lang digeriert. Es wurden dann wiedergefunden 24,99 g. Es hatte sonach keine Zuckerabnahme stattgefunden.

Ganz anders gestaltete sich das Ergebnis bei Zusammenwirken von Leber- und Pankreasbrei.

Tabelle II.
Versuche mit Pankreaszusatz.

Nr. des Vers.	100 g frische Leber enthalten		Zusatz an Glykose g	Ges.-Kohlehydrat vor der Autolyse g	$NaHCO_3$	Dauer der Autolyse	Ges.-Kohlehydrat nach d. Autolyse g	Abnahme	
	Glykogen g	Glykose g						g	Proz.
Id_1	1,12	2,97	25,00	29,09	0	1 Tag	29,41	0	0
IIc	1,34	2,86	25,00	29,20	0	4 Tage	23,53	5,67	19,7
Id_2	1,12	2,97	25,00	29,09	0	7 „	10,52	18,57	63,8
IIIc	1,23	1,11	0	2,34	zugesetzt	8 „	0,76	1,58	67,5
IIId	„	„	0	„	0	8 „	0,50	1,84	78,6

*) Auch Cohnheim hat beim Pankreaspreßsaft die Abwesenheit einer glykolytischen Wirkung nachweisen können.

Wie ersichtlich, hat Pankreaszusatz einen mächtig fördernden Einfluß auf die Zuckerabnahme. Er beschleunigt sie in dem Maße, daß sie zu einem Zeitpunkt, wo die Kontrollprobe noch nichts davon erkennen läßt, bereits mehrere Gramm Zucker beträgt. (Man vergleiche z. B. die mit derselben Leber ausgeführten Versuche II b der Tabelle I und II c der Tabelle II.) Nach achttägiger Digestion hat bei Pankreaszusatz der Zuckerverlust regelmässig eine Höhe erreicht (über 60 Proz. des Anfangsgehalts), wie sie ohne solchen Zusatz in keinem Fall auch bei viel länger dauernder Autolyse beobachtet wurde.

Besonders auffällig erschien der Einfluß des Pankreaszusatzes in nachfolgendem Versuch (IV d)*):

100 g der in Versuch IV b verwendeten Leber hatten, wie aus Tabelle I ersichtlich, bei $3^1/_2$monatlichem Stehen (16./III. bis 30./VI.) nur 0,29 g Kohlehydrat = 12,6 Proz. eingebüßt. Eine sonst gleich behandelte Probe derselben Leber wurde nach viermonatlichem Stehen (16./III. bis 17./VII.) mit 100 g Pankreas versetzt und neuerlich unter Toluol autolysiert. Nach achttägiger Digestion ergab die Titration 0,44 Proz. Zucker, statt 2,34, somit eine Gesamtabnahme von etwa 80 Proz.

Der Zuckerverlust, der schon bei den einfachen Leberversuchen in vielen Fällen auffallend groß ist, erreicht in diesen Versuchen einen erstaunlichen Wert. Es liegt da ein Zuckerumsatz vor, der mit den gewaltigen Leistungen des pflanzlichen Kohlehydratstoffwechsels in eine Reihe gestellt werden kann. Wenn darnach 100 g Leber in acht Tagen 5, 10 g und mehr Glykose so verändern können, daß sie sich dem Nachweis entziehen, so erscheint die Frage um so dringender, was aus dem verschwundenen Zucker geworden ist.

Da man bei der Leberautolyse regelmäßig reichliche Säurebildung beobachtet, die vielfach auf Umwandlung der Kohlehydrate bezogen wird (Magnus-Levy), so liegt die Vermutung nahe, daß auch in meinem Falle der zugesetzte Zucker für die Bildung von Säuren — von Milchsäure, Bernsteinsäure, Buttersäure usw. — Verwendung gefunden hätte.

Die Bestimmung der bei der Autolyse entstehenden ätherlöslichen Säuren in Versuchen, wo dieselbe Leber unter Zufügung neutralisierender Salze teils mit, teils ohne Zuckerzusatz der Autolyse überlassen wurde, ergab keine Stütze für diese Auffassung.

*) Der Versuch konnte erst nach Abschluß meiner Dissertation zu Ende geführt werden, ist daher in dieselbe nicht aufgenommen.

Tabelle III.
Säurebildung bei dreimonatlicher Autolyse.

Nr. des Vers.		Zusatz an neutralisierendem Salz	Zusatz an Glykose g	Bedarf an No-Natron zur Neutralisation der gebildeten ätherlösl. Säuren
VIIIa	100 g Leber + 100 ccm 0,8 proc. NaCl-Lösg	0	0	11,8 ccm
VIIIb	„	2 g $MgCO_3$	0	11,4 „
VIIIc	„	„ „ „ „	10,0	11,0 „
VIIId	„	2 g $CaCO_3$	0	16,8 „
VIIIe	„	„ „ „ „	10,0	16,4 „
VIIIf	„	2 g $NaHCO_3$	0	14,7 „
VIIIg	„	„ „ „ „	10,0	15,2 „

Wie man sieht, scheint zwar das zur Neutralisation zugesetzte Salz einen gewissen Einfluß auf die Menge der gebildeten ätherlöslichen Säuren zu haben, ein Einfluß des Glykosezusatzes ist aber nicht erkennbar. Aber auch sonst haben sich bisher keine Anhaltspunkte zur Erkennung des betreffenden Umwandlungsproduktes ergeben. Eine Vergärung unter reichlicher Kohlensäurebildung, wie sie Stoklasa und Šimáček beobachtet zu haben glauben, war nicht wahrnehmbar; Alkohol konnte ich zwar in einzelnen Versuchen im Destillat nachweisen, aber nicht konstant und vor allem nicht in einer Menge, die zur Deckung des verschwundenen Zuckers auch nur entfernt hingereicht hätte. Ich muß daher wenigstens für meine Versuchsanordnung Feinschmidt darin beistimmen, daß bei der Glykolyse eine alkoholische Gärung nicht vorliegt. Es wird besonderer Versuche bedürfen, die entsprechenden Umwandlungsprodukte zu fassen und der Analyse zuzuführen.

Das Ergebnis meiner Versuche läßt sich kurz dahin zusammenfassen, daß das Lebergewebe die Fähigkeit besitzt, Traubenzucker weitgehend chemisch zu verändern*), und daß diese Fähigkeit durch Pankreasgewebe mächtig gefördert wird. Damit scheint der eingangs entwickelte Gedankengang eine auffallende Bestätigung zu finden. Man könnte sich nun über die Rolle, welche Leber und Pankreas bei der Glykolyse im Tierkörper spielen, folgende einfache Vorstellung bilden: Die Leber besitzt das Vermögen, ihr

*) Ob es sich dabei um einen Abbau oder eine Veränderung anderer Art handelt, mag zunächst unentschieden bleiben.

zuströmenden Zucker zu verändern, dieses Vermögen ist aber an die Bedingung geknüpft, daß ihr vom Pankreas aus ein dazu absolut nötiges — an sich allein unwirksames — Agens, vermutlich ein Proferment oder eine Kinase, zugeführt wird. Die frisch isolierte Leber, die eben erst aus der Verbindung mit dem Pankreas gelöst worden ist, besitzt naturgemäß noch etwas von dem zugeführten Agens und damit in wechselndem Maße glykolytische Wirkung. Zusatz von Pankreas steigert diese Wirkung. Wird der Leber durch Ausschaltung des Pankreas das betreffende Agens dauernd entzogen, so muß ihre glykolytische Wirkung zurückgehen und schließlich verschwinden. Ob dieser Schluß gerechtfertigt ist, werden endgültige Versuche über die glykolytische Leistung der Leber von Tieren ohne Pankreas entscheiden müssen. Vorläufig spricht der Umstand, daß Jacoby, Blumenthal und jüngst Feinschmidt die Leber des Diabetikers frei von glykolytischer Wirkung gefunden haben, sehr für eine solche Auffassung.

Gegen dieselbe könnte der Einwand erhoben werden, daß die in meinen Versuchen beobachtete Glykolyse allzuspät auftrete und zu träge verlaufe, um eine Anwendung auf die vitalen Vorgänge zu gestatten. Doch kann dieses Bedenken nicht entscheidend sein. Einmal kennen wir die Bedingungen der Glykolyse im Körper nicht entfernt genau genug, um sie im Reagenzglas mit annähernd gleichem Erfolg nachahmen zu können. Sodann ist aber der langsame Verlauf der experimentellen Glykolyse in unserem Falle zum Teil dem Umstand zuzuschreiben, daß der in den Leberzellen enthaltene glykolytisch wirkende Stoff erst bei Zerfall der Leberzellen mit dem aus Glykogen entstehenden und dem zugesetzten in Lösung befindlichen Zucker ausreichend in Berührung kommt, daß gewissermaßen zuerst eine „Aufschließung“ der Zellen durch autolytische Fermente erfolgen muß. Möglicherweise ist der raschere Verlauf der Glykolyse bei Pankreaszusatz zum Teil auf eine solche beschleunigte Aufschließung zu beziehen, während sich die intensivere Wirkung aus diesem Umstand nicht wohl erklären läßt.

Immerhin kann diesen Vorstellungen vorläufig nur ein heuristischer Wert zuerkannt werden. Bei der verwickelten Natur der einschlägigen Vorgänge und der großen praktischen Wichtigkeit der Sache erscheint es hier mehr noch als sonst geboten, sich weitgehender Schlußfolgerungen zu enthalten. Vor allem muß nochmals aufs sorgfältigste geprüft werden, ob die beobachtete auffällige Wirkung des Pankreas auf die Glykolyse in der Leber nicht doch noch von Bedingungen abhängt, die mit dem physiologischen Zuckerverbrauch nichts zu tun haben.

A. W. ZICKFELDT, OSTERWIECK/HARZ.

Beiträge

zur

Chemischen Physiologie

und

Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

IV. Band. 12. Heft

(Ausgegeben November 1903)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1903

Inhalt des 12. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XLI.

Über die koagulierende Wirkung autolytischer Organ-Extrakte auf Albumosenlösungen und Milch.

Von Dr. **A. Nürnberg.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.

Die Untersuchungen der letzten Jahre über die autolytischen Veränderungen der tierischen Gewebe haben gelehrt, daß es sich dabei um recht verschiedene chemische Prozesse handelt. Die Eiweißkörper und Nucleoproteide zerfallen allmählich bis zur Entstehung von kristallinischen Produkten, die Kohlenhydrate bis zur Bildung von Fettsäuren, z. B. Milchsäure, Bernsteinsäure, Essigsäure, Buttersäure und Kohlensäure. Diese Veränderungen sind fermentativer Natur, d. h. sie werden von gelösten nichtorganisierten Fermenten, die sich in den Geweben vorfinden, hervorgerufen.

Die große Verbreitung einer labenden Wirkung auf Milch in den Geweben der Tiere und Pflanzen und das in einzelnen Fällen nachgewiesene Nebeneinandervorkommen von labender und proteolytischer Wirkung (Magen-, Pankreas- und Papayotinextrakte) legt die Frage nahe, ob nicht auch die autolysierten Organe Labwirkung besitzen. Das Interesse einer solchen Untersuchung wird wesentlich dadurch gesteigert, daß in der letzten Zeit A. Danilewski, W. Okunew, D. Lawrow, Sawjalow, Kurajeff, Salaskin und M. Lawrow gezeigt haben, daß die Magenschleimhaut-, Pankreas- und Papayotinextrakte neben der labenden Wirkung auf Milch und der proteolytischen Wirkung auf Eiweißkörper auffallenderweise auch eine Einwirkung auf Albumosenlösungen besitzen, indem sie darin eigentümliche Niederschläge (Plasteine und Koagulosen) erzeugen. Es war daher von Interesse zu erfahren, ob die Extrakte von autolysierten Organen außer der eigentlichen Labwirkung auch die Plasteinreaktion aufweisen.

Von einschlägigen Arbeiten sind nur die Untersuchungen von W. Okunew zu erwähnen. Okunew untersuchte die Milch- und Plasteinreaktion von Wasser-, Alkohol- und Glycerinextrakten,

die aus den zerkleinerten und an der Luft getrockneten, frisch dem Tierkörper entnommenen oder durch 24 Stunden in schwach salzsaurem Wasser aufbewahrten Organen dargestellt waren. Magen- und Pankreasextrakte koagulierten Milch und Albumosenlösungen viel stärker als die Extrakte von anderen Organen. Betreffs des Pankreasextraktes gibt Okunew an, daß es sowohl bei neutraler, als auch bei saurer und schwach alkalischer Reaktion auf Albumosenlösungen koagulierend einwirkt. Für die anderen Organe fehlen solche Angaben. Die Leberextrakte nehmen bei Okunew, ihrer Fähigkeit nach, auf Albumosen zu reagieren, unter anderen von ihm geprüften Organextrakten (Magen, Pankreas, Dünndarm) den letzten Platz ein.

Unter anderem beobachtete Okunew, daß die Lösung von Kalbsblutfibrin, das in chloroformhaltigem Wasser lange aufbewahrt worden war, auf Milch und Albumosenlösungen ganz wie Labextrakt koagulierend einwirkt.

Da die Untersuchungen von Okunew in keiner direkten Beziehung zu den autolytischen Veränderungen der Organe stehen, habe ich auf den Vorschlag von Herrn Professor Kurajeff eine Reihe von Versuchen ausgeführt, um die Wirkung der Extrakte autolysierter Organe auf Albumosenlösungen und Milch fürs erste in ihren Hauptzügen zu studieren.

Methodisches.

Für meine Untersuchungen habe ich die im Laboratorium von Hofmeister ausgearbeitete antiseptische Methode (Vergl. Conradi u. a.) benutzt.

Möglichst schnell nach dem Tode des Tieres (im Laufe von 10 Minuten bis 1 Stunde) wurden die zum Versuch bestimmten Organe aus dem Körper entnommen, sorgfältig gereinigt, fein zerhackt und in Kolben mit der doppelten Gewichtsmenge physiologischer Kochsalzlösung (0,7 proz.) verteilt. In jeden Kolben wurden 10 bis 50 ccm Toluol und Chloroform eingebracht, so daß der Boden des Kolbens und die Oberfläche des Inhaltes mit einer 1 cm hohen Schicht des Antiseptikum bedeckt waren. Die Kolben wurden mit Kautschukpfropfen verschlossen in den auf 37 bis 40° C eingestellten Brutschrank gebracht. Von Zeit zu Zeit wurde geschüttelt und noch Antiseptikum zugefügt. Die Reaktion der Extrakte war in allen Kolben schwach alkalisch. Bakterien waren nicht vorhanden.

Die Albumosenlösung wurde aus Hühnereiweiß in folgender Weise bereitet. Das Eiweiß von 25 bis 50 Eiern wurde mit dem vierfachen Volum Wasser vermischt, mit Essigsäure schwach angesäuert, koaguliert, das Eiweißgerinnsel mit Pepsin (1,5 Pepsinum Grübler auf 5 Liter) und 0,5 proz. Salzsäure 2 bis 3 Tage bei 37 bis 40° gehalten. Die Verdauungslösung wurde mit Soda neutralisiert, vom ausgeschiedenen Acidalbumin abfiltriert und auf dem Wasserbade etwas eingedampft. Die benutzten Albumosenlösungen enthielten 10 bis 13 Proz. feste Bestandteile.

Die Versuche mit den Organextrakten wurden in folgender Weise ausgeführt. Für jedes zum Versuch bestimmte Organ wurden in drei Probierröhrchen je 5 ccm neutralisierter Albumosenlösung, in das vierte 5 ccm Kuhmilch eingegossen. Zu einer Probe der Albumosenlösung wurde ein Tropfen (= 0,05 ccm) 12,5 proz. Salzsäure, zur zweiten ein Tropfen 10 proz. Sodalösung zugesetzt, die dritte blieb neutral. Die Milch war immer von schwach alkalischer Reaktion und frisch. Von jedem Organextrakte wurden dann je 20 Tropfen in die vier Probierröhrchen filtriert und die Proben in den Brutschrank eingestellt.

Die Kontrollversuche mit 20 Minuten lang gekochten und filtrierten Extrakten gaben immer negative Resultate.

Die zu den Versuchen benutzten Kaninchen und Hunde wurden durch Verblutenlassen aus den Halsgefäßen im Laboratorium getötet. Die Organe vom Rind und Schwein wurden vom Schlachthaus bezogen.

A. Organe zweier ausgewachsener Kaninchen.

I. 4stündige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung — Eine Stunde im Thermostaten			Albumosenlösung — Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutral	alkal.	sauer	neutral	alkal.
Magen	Gerinnung in 3 Stunden	spärl. flock. Niederschlag	—	kaum trüb	starker flock. Niederschlag	kaum trüb	
Leber	Gerinnung in der 9. Stunde wie in den Kontrollproben mit Milch allein (Leber bis Lungen)	flock. Niederschlag	trüb	kaum trüb	sehr starker flock. Niederschlag	starker Niederschlag	flock. Niederschlag
Milz		kaum trüb	—	—	spärl. flock. Niederschlag	trüb	kaum trüb
Eier		kaum trüb	—	—	ebenso	ebenso	ebenso
Muskeln		etwas Niederschlag	trüb	—	flock. Niederschlag	kaum trüb	trüb
Dünndarm		etwas trüb	trüb	trüb	Trübung		
Dickdarm		kaum trüb	—	—	sehr geringer Nied.	Trübung	
Nieren		kaum trüb	—	—	ebenso	Trübung	
Lungen		trüb	—	—	flock. Niederschlag	Trübung	
Labpulver von Grübler 1,5:50,0	15 Min.						

Kontrollproben: I. 5 ccm aq. destill. + 1 Tropfen HCl von $12\frac{1}{2}$ Proz. + 20 Tropfen der Extrakte = klar.

II. 5 ccm saurer Albumosenlösung + 20 Tropfen aq. dest. = klar.

III. Dieselben Proben wie in den Tabellen nur mit 20 Minuten gekochten Extrakten = klar.

II. 8tägige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung Eine Stunde im Thermostaten sauer	neutral	alkal.	Albumosenlösung Eine Nacht im Thermostaten sauer	neutral	alkal.
Magen	Gerinnung in 2 Stunden	flock. Niederschlag	kaum trüb	–	starker flock. Niederschlag	Trübung	
Leber	In 5 Stunden unvollständ. Gerinnung. Kontrollproben ganz flüssig	starker flock. Niederschlag	sehr trüb		sehr starker flock. Niederschlg.	sehr starker flock. Niederschlag	
Milz		sehr geringer Nied.	kaum trüb			sehr starke Trübung	
Eier		sehr geringer Nied.	Trübung				
Muskeln		ebenso	ebenso				
Dünndarm		Trübung					
Dickdarm		sehr trüb	kaum trüb		sehr starke Trübung	trüb	
Nieren		sehr trüb	Trübung			trüb	
Lungen		flock. Niederschlag	sehr trüb		starker fl. Niederschl.	spärl. flock. Niederschlag	
Labpulver von Grübler 1,5:50,0	15 Min.						

Kontrollproben wie bei A I.

III. 20tägige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung Eine Stunde im Thermostaten sauer	neutr.	alkal.	Albumosenlösung Eine Nacht im Thermostaten sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung ist wie in den Kontrollproben nach 5 Stunden nicht eingetreten	spärl. flock. Niederschlag	kaum trüb		starker flock. Niederschlag	kaum trüb	
Leber		flock. Niederschlag	Trübung		sehr starker flock. Niederschlg.	flock. Niederschlag	
Milz		kaum trüb	–	–		sehr starke Trübung	
Eier		kaum trüb	–	–			
Muskeln		sehr geringer Nied.	trüb	kaum trüb		starke Trübung	trüb
Dünndarm		Trübung	kaum trüb	trüb		trüb	kaum trüb
Dickdarm		Trübung	–	kaum trüb	sehr trüb	trüb	kaum trüb
Nieren		kaum trüb	–	–	sehr trüb	Trübung	
Lungen		sehr geringer Nied.	Trübung		starker Niederschlag	flock. Niederschlag	
Labpulver von Grübler 1,5:50,0	15 Min.						

Kontrollproben wie bei A I.

B. Organe vom Rind.

I. $3^1/_2$stündige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung nach 2 Stunden	trüb	—	—	starker flock. Niederschlag	trüb	kaum trüb
Pankreas	Gerinnung in der ersten Stde.	kaum trüb			spärlicher flockiger Niederschlag		
Dünndarm	Wie die Kontrollproben	trüb	kaum trüb	kaum trüb	sehr geringer Nied.	Trübung	
Dickdarm		kaum trüb		trüb	trüb	sehr geringer Niederschlag	
Leber		sehr trüb	trüb		Gerinnsel	sehr stark flock. Niederschlag	
Milz		trüb	kaum trüb		sehr geringer Nied.	sehr trüb	
Gehirn		trüb		kaum trüb	sehr trüb	sehr geringer Niederschlag	
Lungen		Trübung			flockiger Niederschlag		
Eier		trüb	kaum trüb		trüb	kaum trüb	

Kontrollproben wie bei A I.

II. 8tägige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung nach 3 Stunden	flock. Niederschlag	kaum trüb		Gerinnsel	Trübung	
Pankreas	Gerinnung nach 10 Min.	spärlicher flockiger Niederschlag			sehr starker flockiger Niederschlag		
Dünndarm	Gerinnung nach 4 bis 6 Stund. Kontrollproben flüssig	flock. Niederschlag	sehr geringer Niederschlag		flock. Niederschlag	spärlicher flock. Niederschlag	
Dickdarm		sehr starke Trübung			sehr trüb	trüb	sehr geringer Nied.
Leber		sehr starker flockiger Niederschlag			Gerinnsel	sehr strk. flock. Niederschlag	
Milz		sehr geringer Nied.	trüb	kaum trüb	flock. Niederschlag	Trübung	
Gehirn		sehr trüb	trüb		sehr geringer Nied.	sehr trüb	
Lungen		flock. Niederschlag	sehr geringer Nied.	sehr trüb	starker Niederschlag	flockiger Niederschlag	
Eier		sehr trüb	trüb		kaum trüb	sehr trüb	

Kontrollproben wie bei A I.

III. 20tägige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung nach 5 Stunden	trüb	—	—	flock. Niederschlag	trüb	—
Pankreas	Gerinnung nach 1 Stunde	—	—	—	schwacher flockiger Niederschlag		
Dünndarm	Wie Kontrollproben	—	—	—	sehr ger. Niederschlag		
Dickdarm		trüb	—	trüb	flockiger Niederschlag		
Leber		sehr trüb	kaum trüb		starker flock. Niederschlag		sehr geringer Nied.
Milz		trüb	—	—	sehr geringer Nied.	sehr trüb	
Gehirn		trüb	kaum trüb	kaum trüb	sehr trüb	trüb	kaum trüb
Lungen		sehr trüb	kaum trüb		starker Niederschlag	flockiger Niederschlag	
Eier		—	—	—	sehr trüb	kaum trüb	

Kontrollproben wie bei A I.

C. Organe vom Schwein.

I. $3^1/_2$stündige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung in 30 Min.	flock. Niederschlag	kaum trüb		starkes Gerinnsel	sehr geringer Nied.	trüb
Dünndarm	Gerinnung im Laufe von 3 bis 4 Stunden. Kontrollproben flüssig	sehr trüb	kaum trüb	trüb	sehr geringer Nied.	sehr trüb	
Dickdarm		trüb	kaum trüb		sehr trüb		
Leber		starker flock. Niederschlag	sehr trüb		sehr starker flock. Niederschlag		
Nieren		trüb		kaum trüb	sehr trüb	trüb	
Gehirn		sehr trüb	kaum trüb	trüb	flock. Niederschlag	sehr trüb	
Lungen		flock. Niederschlag	sehr trüb		starker flock. Niederschlag	flock. Niederschlag	sehr trüb
Muskeln		sehr geringer Nied.	trüb		flock. Niederschlag	sehr trüb	
Pankreas	Gerinnung in 15 Minuten	Trübung			flock. Niederschlag	sehr trüb	
Milz	Wie Dünndarm usw.	trüb	kaum trüb		sehr geringer Nied.	sehr trüb	

Kontrollproben wie bei A I.

II. 4tägige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung im Laufe der ersten Stunde	Gerinnsel	trüb		großes Gerinnsel	trüb	
Dünndarm	Gerinnung im Laufe von 2 bis 3 Stunden. Kontrollproben flüssig.	sehr trüb	trüb		sehr trüb	flock. Nied.	starker Nied.
Dickdarm		flock. Nied.	trüb		spärlicher flockiger Niederschlag		
Leber		starker fl. Nied.	flock. Nied.	trüb	sehr starker flockiger Niederschlag		
Nieren		flock. Nied.	trüb		starker Nied.	flockiger Niederschlag	
Gehirn		flock. Nied.	trüb		starker fl. Nied.	flock. Nied.	shr. ger. Nied.
Lungen		starker fl. Nied.	flock. Nied.	trüb	sehr starker flockiger Niederschlag		
Muskeln		flock. Nied.	kaum trüb		sehr starker fl. Nied	flock. Nied.	trüb
Pankreas	Gerinnung nach 8 bis 10 Min.	flockiger Niederschlag		sehr gering. Nied.	starker Nied.	flockiger Niederschlag	
Milz	Wie Dünndarm usw.	flock. Niederschlag	Trübung		sehr starker fl. Nied.	flockiger Niederschlag	

Kontrollproben wie bei A I.

III. 16tägige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung nach 1 Stunde	trüb	—	—	starker flock. Nied.	—	—
Dünndarm	Gerinnung im Laufe von 3 bis 4 Stunden. Kontrollproben negativ.	trüb	kaum trüb		starke Trübung		
Dickdarm		trüb		—	Trübung		
Leber		flock. Nied.	kaum trüb		sehr starker flockiger Niederschlag		
Nieren		trüb	—	—	starker Nied.	flockiger Niederschlag	
Gehirn		kaum trüb	—	—	flock. Nied.	spärl. Nied.	sehr trüb
Lungen		sehr gering. Nied.	—	—	starker fl. Nied.	flock. Nied.	flock. Nied.
Muskeln		kaum trüb	—	kaum trüb	sehr starker Nied.	flock. Nied.	sehr trüb
Pankreas	Gerinnung nach 20 Min.	Trübung			spärlicher flockiger Niederschlag		
Milz	Wie Dünndarm usw.	kaum trüb	—	—	spärlicher flockiger Niederschlag		

Kontrollproben wie bei A I.

D. Organe vom Hunde.

I. 4½stündige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung nach 1 Stunde	sehr geringer Nied.	kaum trüb		starker flock. Niederschlag	kaum trüb	
Leber	nach 5 Stunden	flock. Niederschlag	Trübung		starker flockiger Niederschlag		
Pankreas	20 Min.	Trübung			flockiger Niederschlag		

Kontrollproben wie bei A I.

II. 4tägige Autolyse.

	Milch	Albumosenlösung					
		Eine Stunde im Thermostaten			Eine Nacht im Thermostaten		
		sauer	neutr.	alkal.	sauer	neutr.	alkal.
Magen	Gerinnung nach ½ Stunde	flock. Niederschlag	kaum trüb		sehr starker Niederschlag	trüb	
Leber	nach 2½ Stunden	sehr starker flock. Niederschlag			sehr starker flock. Niederschlag		
Pankreas	7 Min.	sehr trüb	Trübung		Flockiger Niederschlag		

Kontrollproben wie bei A I.

Ergebnisse.

Aus den angeführten Tabellen ist ersichtlich, daß die autolytischen Extrakte von Lebern im Vergleich mit denjenigen anderer Organe auf Albumosenlösungen am stärksten koagulierend einwirken. Dann folgen Magen- und Lungenextrakte, erst nach diesen Pankreas-, Dünndarm-, Dickdarm-, Nieren-, Gehirn-, Eier- und Muskelextrakte. Die Organe dieser Serie unterscheiden sich in ihrer koagulierenden Wirkung auf Albumosen wenig und stehen der Leber, den Lungen und dem Magen in dieser Beziehung sehr nach.

Ganz anders gruppieren sich die untersuchten Organe in betreff der Milchgerinnung. Hier stehen die Pankreasextrakte an erster Stelle und die frischesten davon geben der Lablösung in der Raschheit der Wirkung wenig nach. Während die zur Milchlabung durch Pankreasextrakt nötige Zeit nach Minuten zu rechnen ist, bedürfen die anderen Extrakte dazu einer oder

mehrerer Stunden. Nur das frische Magenextrakt wirkt energischer aber immerhin nicht so, wie das Pankreasextrakt.

Was den Einfluß der Reaktion der Albumosenlösung auf die koagulierende Wirkung der Organextrakte anlangt, so zeigen die geprüften Organe im ganzen eine größere Koagulierungskraft bei schwach saurer als neutraler und schwach alkalischer Reaktion. Die Magenextrakte geben in schwach sauren Albumosenlösungen ziemlich starke flockige Niederschläge, in alkalischen und neutralen kaum eine Trübung, die Pankreasextrakte wirken trotz wechselnder Reaktion nahezu gleich, ebenso wirken auch frische Leberextrakte sehr stark sowohl bei saurer als auch neutraler oder schwach alkalischer Reaktion, die Wirkung der Darmextrakte ist in dieser Beziehung nicht konstant, die Gehirn-, Muskeln-, Nieren- und Eierextrakte koagulieren die sauren Lösungen am besten, doch ist der Einfluß der Reaktion hier nicht so groß wie bei den Magenextrakten.

Es erübrigt noch, den Einfluß der Dauer der Autolyse der Organe auf die Intensität der Gerinnungswirkung zu besprechen. Die 16stündigen Organextrakte zeigten immer die größte Energie der Wirkung, was sich in der schnelleren Bildung von Trübung und Niederschlägen zeigte (nach $^1/_2$ Stunde). Die frischeren (3 bis 4 Stunden alten) wie auch die älteren (bis 3 bis 4 Wochen alten) Organextrakte erreichten manchmal dieselbe Wirkungskraft wie die 16stündigen, aber erst nach längerer Einwirkung auf Albumosenlösung (nach 18 Stunden). Die Organextrakte vom Schwein zeigten im Vergleich mit denjenigen von anderen Tieren (Hund, Rind, Kaninchen) augenscheinlich die intensivste koagulierende Wirkung.

Schlußbemerkungen.

Schon Salkowski hat in seinen Untersuchungen über die Veränderungen der Organe nach dem Tode bei ausgeschlossener Bakterienentwickelung („Autodigestion" Salkowski, „Autolyse" Jacoby) auf die Wichtigkeit dieser Veränderungen zur Erklärung der Natur des Abbaues der Gewebe und Organe im lebenden Organismus hingewiesen. Spätere Forscher (z. B. Schlesinger) weisen auf die Analogie der autolytischen Veränderungen im lebenden Organismus bei Störungen der Zirkulation mit denjenigen bei künstlich erzeugter Autolyse hin. Dieser Umstand macht die große Mannigfaltigkeit der bei der Autolyse gefundenen Fermentwirkungen noch interessanter. Man kann jetzt außer von der proteolytischen, lipolytischen (Kraus, Siegert) und glykogenspaltenden Fermentwirkung der autolytischen Organextrakte auch

von einer plasteinogenen und milchlabenden sprechen. Weitere chemische Untersuchungen über die Natur der durch autolytische Organextrakte in Albumosenlösungen erzeugten Niederschläge werden die Frage über ihre plasteinogene Funktion endgültig aufklären.

Die Frage, ob es ein oder zwei Fermente sind, die in den autolytischen Organextrakten einerseits auf die Albumosen, andererseits auf die Milch einwirken, wie auch, ob diese Fermente bei verschiedenen Organen identisch sind, müssen wir offen lassen. Jedenfalls haben wir weder einen vollständigen Parallelismus in der Wirkung eines einzelnen bestimmten autolytischen Extraktes, noch auch der verschiedenen Extrakte auf Albumosen und Milch gefunden.

Die Fähigkeit autolysierter Organe, verschiedene Fermentwirkungen (proteolytische, labende, plasteinogene usw.) hervorzubringen, ist derjenigen der frischen Organe (bzw. ihrer Extrakte) ganz analog. Wie es scheint, besteht überall im Organismus, wo sich das eine oder das andere proteolytische Ferment vorfindet, auch die Fähigkeit, Albumosen und Milch mehr oder weniger energisch zur Gerinnung zu bringen. Wenn es gestattet ist anzunehmen, daß dasselbe komplizierte Pepsin- und Trypsinmolekül (Nencki, Pawlow, Pekelharing, Vernon) verschiedener Fermentwirkungen fähig ist, so kann man mit gleichem Recht dieselbe Annahme auch für das proteolytische Ferment (bzw. die Fermente) der Autolyse machen. Weitere Untersuchungen müssen diese wichtige Frage beantworten.

Literaturverzeichnis.

1) Sawjalow, Zur Theorie der peptischen Verdauung. Dissert. Jurieff 1899. (Russisch.)

2) Okunew, Beiträge zur Biologie des Chymosins. Botkins Krankenhauszeitung 1901. Sep.-Abdr. (Russisch.)

3) Okunew, Die Wirkung des Chymosins bei den Assimilationsprozessen im Organismus. Dissert. St.-Petersburg 1895. (Russisch.)

4) Kurajeff, Über die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Peptonlösungen. Diese Beitr. **1**, 121, **2**, 411.

5) Conradi, Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. Diese Beitr. **1**, 136.

6) Conradi, Über die Bildung bakterizider Stoffe bei der Autolyse. Ibidem **1**, 193.

7) Benjamin, Beiträge zur Lehre von der Labgerinnung. Virchows Archiv **145**, 30.

8) Nencki und Sieber, Beiträge zur Kenntnis des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme. Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 291.

9) Nencki, O zadaniach biologiczne Chimie. Kraków.

10) Pawlow, Vorlesungen über die Arbeit der Verdauungsdrüsen. St.-Petersburg 1897. (Russisch.)

11) Pekelharing, Mitteilungen über Pepsin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **35**, 8.

12) Vernon, The precipitability of pancreatic ferments by Alcohol. Journal of Physiol. **29**, 302 (28. IV.). — Autoref. Bioch. Zentralbl. I, Nr. 13.

13) Jacoby, Zur Frage der spezifischen Wirkung der intracellulären Fermente. Diese Beitr. **3**, 446.

14) Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente. Inaug.-Dissert. Straßburg 1901. Cit. nach Schlesinger (15).

15) Schlesinger, Untersuchungen über die Abhängigkeit der autolytischen Prozesse von physiologischen und pathologischen Verhältnissen. Diese Beitr. **4**, 87.

16) Jacoby, Über die fermentative Eiweißspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 149; 1900.

XLII.

Über die plasteinogene Substanz.

Von cand. med. **H. Bayer.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg i. E.

I.

Seit A. Danilewski beobachtet hat, daß Labferment in Albumosenlösungen einen Niederschlag erzeugt, der in seinen äußeren Eigenschaften koaguliertem Eiweiß gleicht, ist über ähnliche Fermentreaktionen von Danilewskis Schülern und auch von anderen Beobachtern*) mehrfach berichtet worden. Danach haben Pepsin und Trypsin**), bzw. Magensaft***) und Pankreassaft†), aber auch Darmsaft††) und Papayotin†††) und die bei Autolyse verschiedener Organe erhältlichen Flüssigkeiten*†) eine ganz analoge Wirkung.

Danilewski hat seinem ersten Befund dadurch ein besonderes Interesse verliehen, daß er die beobachtete Niederschlagsbildung als eine Rückbildung von Eiweiß aus Verdauungsprodukten auffaßte. Diese Vorstellung hat dann, wenn auch zum Teil in abgeänderter Form, alle späteren Untersuchungen beeinflußt. Daneben darf aber auch die damit zusammenhängende Frage nach

*) Okunew, Wratsch Nr. 42, 1895. Jahresbericht für Tierchemie 291 (1895). Wratsch Nr. 21, 1900. Vgl. Kurajeff, Diese Beiträge **1**, 123. B. Schapirow, Diss. Jurjew 1896, Jahresber. für Tierchemie 400 (1896). Sawjalow, Pflügers Archiv **85**, 171 (1901). R. O. Herzog, Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 305 (1903). Lawrow u. Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 277 (1902).

**) R. O. Herzog, loc. cit.

***) Lawrow u. Salaskin, loc. cit.

†) Okunew, loc. cit.

††) Okunew, loc. cit.

†††) Kurajeff, Diese Beiträge **1**, 121, **2**, 411, **4**, 476.

*†) Nürnberg, Diese Beiträge **4**, 543.

einer synthetischen (bzw. reversiblen) Wirkung der dabei tätigen Fermente, sowie auch der nähere chemische Aufbau der neugebildeten Produkte auf Interesse Anspruch erheben.

In den nachstehend mitzuteilenden Versuchen habe ich mich darauf beschränkt, eine einzelne unter den sich ergebenden Fragen näher zu untersuchen. Wie bekannt, zerfällt das Eiweißmolekül bei der Verdauung in eine ganze Anzahl von größeren und kleineren Bruchstücken. Entsteht in einer Verdauungslösung durch fermentative Wirkung ein Niederschlag von „Plastein“ — mit diesem Namen bezeichnet Sawjalow die durch Chymosin erhältliche Substanz — so kann dieses Plastein ebensowohl durch Übergang eines bestimmten solchen Bruchstückes, z. B. einer Albumose, in unlösliche Form, oder durch Aneinanderlagern (Kondensation) einer Anzahl gleicher Bruchstücke, oder aber durch Aneinanderlagern einer Anzahl unter sich verschiedener Bruchstücke entstanden sein, wobei noch ganz offen bleiben mag, ob es sich dabei um eine Polymerisierung, Anhydridbildung oder einen anderen chemischen Vorgang handelt.

Nun besteht aber weiter die Möglichkeit, daß in derselben Lösung nebeneinander verschiedene Plasteine entstehen, sei es, daß mehrere von den vorhandenen Verdauungsprodukten die Fähigkeit besitzen, unter dem Einfluß von bestimmten Fermenten in eine unlösliche Form überzugehen, sei es, daß die Verdauungsprodukte sich untereinander je nach den äußeren Bedingungen in verschiedener Art zu höheren Komplexen vereinigen. Es könnte sonach das beim Versuch erhaltene „Plastein“ trotz gleichen Ausgangsmaterials kein einheitlicher Stoff, sondern ein wechselndes Gemenge solcher Umwandlungsprodukte sein, eine Auffassung, die in den keineswegs übereinstimmenden Angaben der Beobachter über die Eigenschaften der erhaltenen Plasteine recht wohl eine Stütze finden kann. Daß die durch verschiedene Fermente erhaltenen Plasteine nicht identifiziert werden dürfen, geht schon jetzt sehr deutlich aus Kurajeffs Beobachtungen hervor, welche zeigen, daß die durch Lab und durch Papayotin aus derselben Lösung erhaltenen Produkte, die Labplasteine und die Papayotinplasteine (Kurajeffs Koagulosen) auseinander gehalten werden müssen.

Dieser verwickelten Sachlage gegenüber erschien es notwendig, die Bildung der Plasteine unter möglichst einfachen Verhältnissen zu verfolgen, und ich glaubte das am besten zu erreichen, indem ich mich 1. auf ein einziges Ferment beschränkte, und zwar das Lab, 2. indem ich aus dem Gemenge von Produkten.

welche sich in den Verdauungslösungen finden, mit Hilfe der Labreaktion jene zu isolieren suchte, die ausschließlich oder vorwiegend an der Plasteinbildung beteiligt sind. Der Kürze wegen will ich diese Muttersubstanz des Plasteins nach Analogie des Fibrinogens als „Plasteinogen“ bezeichnen, wobei gleich von vorneherein bemerkt sein mag, daß damit die Existenz mehrerer auf Lab reagierender Plasteinogene nicht ausgeschlossen werden soll.

Von bisher gemachten Angaben über die Muttersubstanz des Labplasteins verdienen die folgenden Erwähnung.

Lawrow*) untersuchte die Beziehungen einiger von ihm isolierter Verdauungsprodukte zum Labferment und faßt das Resultat seiner Arbeit in folgende Sätze zusammen:

1. Die durch Ammonsulfat nicht fällbaren Produkte der peptischen und tryptischen Verdauung albuminisieren sich nicht durch Labferment.

2. Das durch Ammonsulfat fällbare, durch Ferrocyankalium und Essigsäure jedoch nicht fällbare und einige Farbenreaktionen des Eiweiß nicht gebende Gemenge der Produkte der peptischen Fibrinverdauung albuminisiert sich nicht durch das Labferment, sondern dehydriert sich nur; die bei Behandlung einer Mischung dieser Lösungen mit Lab erhaltenen Niederschläge geben nicht die Reaktionen von Adamkiewicz, Liebermann und Pettenkofer.

Sawjalow**) ließ Labferment auf „Proto-, Hetero-, Deuteroalbumosen, Ampho- und Antipepton“ einwirken und bestimmte die Menge des entstandenen Niederschlags. Sie betrug bei Protoalbumose 10,09, bei Heteroalbumose 26,59, bei „Deuteroalbumose“ 2,85, bei „Amphopepton“ 0,92 Proz. des Ausgangsmaterials, während „Antipepton“ keinen Niederschlag gab. Sawjalow faßt das Ergebnis dahin zusammen, daß, je näher das gegebene Verdauungsprodukt dem nativen Eiweiß steht, in desto größerem Maßstabe es fähig sei, durch Regeneration Eiweiß zu geben.

Kurajeff***) untersuchte nach E. P. Pick möglichst rein dargestellte Albumosen aus Wittepepton und Kasein. Bei Hetero- und Protalbumosen aus Fibrin vermißte er jede Labwirkung. Hingegen gaben A- und B-Albumose 3 bis 4 Proz. ihres Gewichts an Plastein. Protokaseose gab mit Lab keinen Niederschlag oder nur eine geringe Trübung, A-Deuterokaseose dagegen eine beträchtliche Fällung (etwa 4 Proz. des Ausgangsgewichts). Die erhaltenen Plasteine gaben Biuretreaktion mit rotvioletter Farbe,

*) D. Lawrow, Diss. St. Petersburg 1897 (russisch). Cit. bei Sawjalow Pflügers Archiv 85, 171. Mir leider im Original nicht zugänglich.

**) loc. cit. S. 191.

***) Kurajeff, Diese Beiträge 2, 412 u. ff.

Millonsche und Adamkiewiczsche Probe, bei der Prüfung auf abspaltbaren Schwefel Spuren von Braunfärbung.

M. Lawrow und S. Salaskin*) gelangten zu dem Ergebnis, daß in konzentrierten Witte-Peptonlösungen unter Einwirkung von Magensaft bei allen Arten Albumosen Bildung von Niederschlägen stattfindet. Demgegenüber enthielten Albumosenlösungen, die in diesen Versuchen durch wiederholte Einwirkung von Lab, bzw. Magensaft, die Fähigkeit eingebüßt hatten, damit weiter zu reagieren, immer noch alle Albumosenfraktionen.

Die erhaltenen Plasteine besitzen nach Lawrow und Salaskin in gewisser Hinsicht den Charakter von Albumosen; sie zeigen Biuretreaktion mit violettroter Färbung, die Xanthoproteinreaktion bereits in der Kälte, und zerfallen unter Einwirkung von Darmsaft unter Bildung von Leucin und Tyrosin. Die Ausbeute an Plastein betrug bei der nach E. P. Pick dargestellten II. Fraktion von Wittepepton 12,2 Proz., bei der III. Fraktion 5,9 Proz., bei der IV. nur 1,5 Proz., im Gemisch der II., III. und IV. Fraktion 7,99 Proz. des Ausgangsmaterials.

Endlich hat Kurajeff**) jüngster Zeit aus kristallisiertem Eieralbumin einmal nach 3tägiger, ein andermal nach 18tägiger Verdauung Plasteine aus der Verdauungslösung zu 7,3 Proz. des Ausgangsmaterials erhalten. Sie gaben Biuretreaktion, die Probe nach Molisch, Adamkiewicz und die Schwefelbleiprobe.

II.

Bei der geringen Übereinstimmung dieser Angaben ist es aussichtslos, aus ihnen Schlüsse auf die Natur der plasteinogenen Substanz ziehen zu wollen. Namentlich fällt auf, daß einerseits Sawjalow die größte Plasteinausbeute bei denjenigen Albumosen findet, die dem Eiweiß am nächsten stehen, andererseits Kurajeff bei den „primären" Verdauungsprodukten, der Proto- und Heteroalbumose, die Plasteinbildung ganz vermißt. Dazu kommt, daß, wie meist berichtet wird, die plasteinogene Substanz schon in der ersten Zeit der Verdauung auftritt, somit nicht unter den Endprodukten der Pepsinverdauung zu suchen ist, während ihr doch der Angabe Lawrows zufolge die Reaktion von Adamkiewicz fehlt, was wieder auf eine weit fortgeschrittene Eiweißspaltung hinweist.

Nun kommt für die Beurteilung der meisten dieser Angaben noch in Betracht, daß der Plasteinniederschlag in einem Gemenge

*) Lawrow u. Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 277.
) Kurajeff, Diese Beiträge **4, 476.

von Albumosen erzeugt wurde und daß bei der Art der Plasteinausscheidung in Form eines voluminösen, flockigen Niederschlags oder gar einer Gallerte die Gefahr nahe liegt, daß der Plasteinniederschlag etwa wie ein Fibringerinnsel schwer diffundierende Stoffe der Lösung, z. B. Heteroalbumose und andere Albumosen, einschließt, und so nicht bloß eine Gewichtsvermehrung erfährt, sondern auch in seinen Reaktionen natürlich das Verhalten der eingeschlossenen Albumosen aufweist.

Daher habe ich, um etwas über die Natur der plasteinogenen Substanz zu erfahren, durch eine möglichst weitgehende Fraktionierung vor dem Zufügen von Lab eine Abtrennung der nicht zugehörigen Stoffe zu erzielen gesucht.

Da mir einige aus Wittepepton dargestellte, weit gereinigte Albumosenpräparate des hiesigen Instituts zur Verfügung standen, habe ich zunächst an solchen die Plasteinreaktion versucht. Es war leicht, die Angabe Kurajeffs zu bestätigen, daß nach E. P. Pick dargestellte, möglichst reine Proto- und Heteroalbumose keine Plasteine bildet. Überraschenderweise fand ich aber auch Thio- und Glykoalbumose völlig indifferent.

Ich wandte daher zur möglichst weitgehenden Isolierung der plasteinogenen Substanz nicht die Ammonsulfatmethode, sondern die gewöhnlichen Lösungsmittel an. Als Ausgangsmaterial diente mir Wittepepton, als Labferment benutzte ich meist das „Pegnin“ der Höchster Farbwerke, ein sehr wirksames, aber milchzuckerhaltiges Präparat. Für bestimmte Zwecke — so für die Reindarstellung des Plasteins zur Analyse — stellte ich mir nach Glaeßners*) Verfahren mit Hilfe von Uranylacetat und Uranylphosphat reines Prochymosin dar.

Um die erhaltenen Fraktionen auf Plasteinbildung zu prüfen, versetzte ich die auf etwa 10 bis 20 Proz. eingedickte Lösung mit Salzsäure bis zu einem Gehalt von 0,3 Proz., dann mit der Lablösung und ließ sie 24 Stunden im Brutofen stehen. Hatte sich kein oder nur ein minimaler Niederschlag gebildet, so versetzte ich die Probe meist nochmals mit Lab.

Die etwa ausgeschiedenen Niederschläge wurden auf die wichtigsten Eiweißreaktionen untersucht.

Die Fraktionierung gestaltete sich wie folgt:

1. Fällung mit 1 Vol. 95proz. Alkohols.

In der Kälte hergestellte 10proz. Wittepeptonlösung wurde mit dem gleichen Volumen 95proz. Alkohols versetzt. Dabei fiel ein dichter Niederschlag aus, der abfiltriert und vom Alkohol befreit wurde.

*) Glaeßner, Diese Beiträge 1, 1.

Der Niederschlag gibt in Wasser gelöst und mit Salzsäure angesäuert auf Pegninzusatz nur eine minimale Fällung.

Eine Probe des alkoholischen Filtrats gibt nach Entfernung des Alkohols bei gleicher Behandlung dichten Plasteinniederschlag, der auf der Zentrifuge abgetrennt und so lange gewaschen wird, bis das Waschwasser keine Millonsche Reaktion mehr gibt. Die Reaktionen des Produkts sind aus der am Schlusse beigefügten Tabelle ersichtlich.

2. Fällung der alkoholischen Lösung mit 2 Vol. Aceton.

Es fällt ein milchiger Niederschlag aus, der abzentrifugiert und vom Aceton befreit wird. In der Lösung des Niederschlags versagt die Plasteinreaktion völlig. Eine Probe des Acetonfiltrats gibt nach Entfernung des Acetons in wässeriger Lösung mit Lab einen dichten Niederschlag.

3. Fällung des acetonlöslichen Anteils mit 80proz. Alkohol.

Die von Alkohol und Aceton befreite Substanz wurde in konzentrierter wässeriger Lösung mit so viel 95proz. Alkohol versetzt, daß der Gehalt durchschnittlich 80 Proz. betrug. Der Niederschlag gibt kein Plastein, wohl aber das Filtrat.

Die Eigenschaften der aus den verschiedenen Fraktionen erhaltenen völlig ausgewaschenen Plasteine sind aus den nachstehenden zwei Tabellen ersichtlich. Dabei ist in erster Reihe der direkt aus Wittepeptonlösung erhältliche Niederschlag angeführt.

Löslichkeitstabelle.

Plastein aus	In Wasser	In 95proz. Alkohol	In Natronlauge	In verd. Sodalösung	In überschüssiger Essigsäure	In verd. Salzsäure
Witte-pepton	unlöslich	—	leicht löslich	größtenteils schon in der Kälte löslich, beim Erwärmen ganz	—	—
etwa 50proz. Alkohol-Auszug	unlöslich	—	leicht löslich	leicht löslich	langsam (in Eisessig leicht) löslich	sehr schlecht löslich
Alhohol-Aceton-Auszug	unlöslich	löslich	z. Teil löslich (nicht in NH_3)	unlöslich	bei Erwärmen löslich	unlöslich selbst bei Erwärmen
80proz. Alkohol-Auszug	unlöslich	größtenteils löslich	im Überschuß löslich	unlöslich	in der Wärme löslich	löslich

Tabelle der Eiweißreaktionen.

Plastein aus	Biuretprobe	Millons Reaktion	Salpetersäure (Xanthoproteinreaktion)	Molischs Reaktion	Schwefelbleiprobe
Wittepepton	sehr deutlich	sehr deutlich	sehr deutliche Xanthoproteinreaktion	sehr deutlich	sehr deutlich Schwarzfärbung
etwa 50proz. Alkohol-Auszug	sehr deutlich	sehr deutlich	sehr deutliche Xanthoproteinreaktion	sehr deutlich	bloß Graufärbung
Alkohol-Aceton-Auszug	erheblich schwächer	erheblich schwächer	löslich in verd. NO_3H mit Xanthoproteinreaktion	schwach	fehlt
80proz. Alkohol-Auszug	fehlt	fehlt	löslich in warmer, verd. NO_3H, keine Färbung	—	fehlt

Das Plastein aus dem Extrakt mit 50proz. Alkohol gibt bei Kalischmelze keinen Indolgeruch und eine sehr schwache Reaktion nach Adamkiewicz und Hopkins. Es enthält keinen Phosphor.

Das überraschende Ergebnis dieser Versuche läßt sich dahin zusammenfassen, daß die Plasteine mit zunehmender Reinigung rasch die charakteristischen Reaktionen der Eiweißstoffe einschließlich der Biuret- und der Millonschen Reaktion einbüßen. Will man nicht die Annahme machen, daß durch den Gerinnungsvorgang die typischen Eiweißreaktionen verschwinden — eine Annahme, die im Hinblick auf das Verhalten anderer, durch Gerinnung erhaltener Eiweißstoffe, wie Fibrin, Myosin und Kasein, kaum Anklang finden dürfte — so muß man auch der Muttersubstanz dieser Plasteine, dem Plasteinogen, die typischen Eiweißreaktionen absprechen.

Das Plasteinogen kann danach garnicht den Albumosen angehören, auch nicht den Peptonen, sondern nur den Peptoiden, jener noch wenig gekannten Gruppe von Spaltungsprodukten des Eiweiß ohne Biuretreaktion, die, wie zuerst Zunz gezeigt hat, bei der Pepsinverdauung sehr früh und in erheblicher Menge entstehen. Soweit sich aus den Reaktionen der möglichst reinen Plasteine entnehmen läßt, fehlen ihnen gewisse Kerne, die für Eiweißkörper sonst so charakteristisch sind, der Tyrosin-, der Cystinkern, vielleicht auch der Kohlehydrat- und der Indolkern. Das Plasteinogen wäre danach ein in 80proz. Alkohol und Aceton lösliches Peptoid von vermutlich sehr einfacher Zusammensetzung.

Wenn die Plasteine, die aus Wittepepton selbst und aus so ausgiebig fraktionierten Albumosenlösungen erhalten wurden, noch die typischen Eiweißreaktionen darbieten, so ist die Vermutung

gestattet, daß es sich in diesem Falle noch um Beimengung von Albumosen handelt. Es soll aber nicht bestritten werden, daß möglicherweise die plasteinogene Substanz bei Anwesenheit von Albumosen durch Lab zu anderen Produkten führt, als wenn sie vorher durch die Alkoholacetonfraktionierung annähernd isoliert ist. Es ist in der Tat denkbar, daß sich bei dieser fermentativen, durch Lab eingeleiteten Umwandlung vorhandene Albumosenmoleküle an das Plasteinogen anlagern. Immerhin hat es nach dem Gang der Fraktionierung (die übrigens mit dem gleichen Ergebnis wiederholt wurde) durchaus den Anschein, daß nur das keine Biuretreaktion mehr darbietende Plasteinogen die äuf Lab reagierende Gruppe enthält.

III.

Als nächste Aufgabe ergab sich, die Zusammensetzung und den Aufbau des Plasteinogens näher zu untersuchen. Ich habe diese Frage aus äußeren Gründen nur soweit in Angriff nehmen können, daß ich einiges über die Zusammensetzung des aus dem Alkoholextrakt dargestellten Plasteins berichten kann.

Ich extrahierte ein Kilo trockenes Wittepepton direkt mit großen Mengen 95proz. Alkohols. Trotz wochenlang fortgesetzten Ausziehens konnte kein Punkt erreicht werden, wo nichts mehr in Lösung gegangen wäre. Aus dem heißen Alkoholfiltrat setzte sich beim Erkalten stets ein feinpulveriger, beinahe kristallinisch aussehender Niederschlag ab, der sich bei der Fraktionierung mit Ammonsulfat als aus verschiedenen Albumosenfraktionen zusammengesetzt ergab, unter denen allerdings die Protalbumose überwog.

Nach Abschluß der Extraktion wurde sowohl der unlösliche Rückstand, als der beim Erkalten ausfallende Niederschlag und die alkoholische Lösung in bekannter Weise auf die Gegenwart von Plasteinogen geprüft. Der Rückstand gab gar keine, der Kälteniederschlag nur eine minimale, das Alkoholextrakt dagegen eine ausgesprochene Plasteinabscheidung. Die alkohollösliche Fraktion wurde nun wie oben mit Aceton behandelt. Die Aceton-Alkohollösung enthielt das Plasteinogen, welches nach Entfernung des Alkohols durch reines Lab in Plastein übergeführt wurde. Es fiel innerhalb weniger Minuten in feinen Flocken aus, zeigte das oben für das reinste Plastein angegebene Verhalten, nur mit dem Unterschied, daß es zwar keine Biuret- und keine Schwefelreaktion, aber doch eine schwache Millonsche und Hopkinssche Reaktion gab. Der Niederschlag wurde mit Wasser sorgfältig ausgewaschen, dann über Schwefelsäure im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und zur Analyse gebracht.

0,1179 Substanz: 0,1662 CO_2 und 0,0739 H_2O
0,1212 Substanz: 8,55 ccm N bei 21,6° und 761 mm Hg

gefunden C = 38,43 Proz.
H = 7,01 „
N = 8,05 „
C : N = 4,775.

Sawjalow findet für Plasteine aus Eiereiweiß-, Muskel- und Kaseinalbumosen im Mittel:
C = 54,93 Proz., H = 7,29 Proz., N = 14,73 Proz., C : N somit 3,729.

Kurajeff für Plastein aus Kaseosen:
C = 57,03 Proz., H = 7,14 Proz., N = 14,55 Proz., C : N somit 4,576
und für Plastein aus den Albumosen des kristallisierten Eieralbumins:
C = 58,87 Proz., H = 7,28 Proz., N = 14,38 Proz., C : N somit 4,095.

Während Sawjalows Analysenzahlen noch der Zusammensetzung typischer Eiweißkörper nahestehen, entfernen sich jene Kurajeffs und meine davon in einem Maße, daß hier an eine Regeneration von Eiweiß durch Plasteinbildung nicht mehr gedacht werden kann. Dabei möchte ich auf die absoluten Prozentzahlen nicht allein Gewicht legen, da sie von dem Grade des Trocknens nicht unabhängig sind, sondern vor allem auf das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff, das bei Kurajeff und noch mehr bei mir eine Verschiebung gegenüber der gewöhnlichen Zusammensetzung der Eiweißstoffe aufweist, die nur bei Entstehung der Plasteine nicht aus dem Eiweißmolekül selbst, sondern aus ihm schon recht fernliegenden Bruchstücken, wie es z. B. die Peptoide, d. h. die nicht Biuretreaktion gebenden aber doch noch aus mehreren Aminosäuren aufgebauten Verdauungsprodukte, sind, verständlich ist.

Es führt somit die Analyse der Plasteine zu demselben Schlusse, zu dem ich oben auf Grund der Reaktionen derselben gelangt bin. Kann danach auch die ursprüngliche Vorstellung Danilewskis über die Bedeutung der Plasteinbildung als einfacher Regeneration des verdauten Eiweißes, und auch die Anschauung Sawjalows, daß die Plasteinbildung bei verschieden zusammengesetzten Eiweißstoffen zur Bildung des gleichen „Anhydrideiweißes“ führt, nicht aufrecht gehalten werden, so ist damit nicht ausgeschlossen, daß Danilewskis fruchtbarer Gedanke, wenngleich in etwas anderem Sinne, doch noch eine Bestätigung findet. Die so allgemeine Verbreitung plasteinbildender Fermente in tierischen und pflanzlichen Geweben weist geradezu darauf hin, daß die Zellen über Fermente gebieten, die ihnen zugeschwemmte Bruchstücke des Eiweißmoleküls durch Überführung in unlöslichen Zustand festzuhalten, vielleicht sogar durch einen Kondensationsvorgang den Eiweißkörpern des Protoplasmas bzw. des Blutes anzugliedern vermögen.

Nach chemischer Richtung aber fordert die Tatsache, daß durch die Plasteinreaktion sonst nicht faßbare Spaltungsprodukte des Eiweißes isoliert werden können, dringend zur weiteren Untersuchung der einschlägigen Produkte auf.

XLIII.

Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin.

Von Dr. **Leopold Moll**, Assistenten des Instituts.

Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag.

Die mannigfachen Veränderungen, welche die Immunkräfte eines Serums durch Erhitzen desselben auf bestimmte empirisch gefundene Temperaturen erfahren, legten es nahe, festzustellen, ob dieselben nicht von analytisch nachweisbaren Veränderungen in der Zusammensetzung des Serums begleitet sind, beziehungsweise ob die letzteren in etwaigem Zusammenhange mit den ersteren stehen. Der negative Ausfall von bereits vorliegenden Untersuchungen über Unterschiede des erhitzten und unerhitzten Serums in bezug auf Gefrierpunkt und elektrisches Leitvermögen [Dietrich, v. Zeynek, E. P. Pick][1]) konnten nicht entmutigen, die aufgeworfene Frage zu verfolgen, da die von den genannten Autoren benutzten Methoden zur Konstatierung der betreffenden komplizierten Vorgänge in Eiweißlösungen unzulänglich sein konnten.

I.

Meine Untersuchungen gingen von folgenden Befunden aus:

1. Eine Stunde auf 60° erwärmtes Blutserum läßt nach Verdünnen mit Wasser und Ansäuern mit verdünnter Essigsäure (0,01 Proz.) einen Niederschlag ausfallen, welcher im Vergleich zu dem in gleicher Weise erzielten Niederschlag aus einer ebenso großen Menge unerhitzten Serums viel mächtiger ist und auf Zusatz von verdünnter neutraler Kochsalzlösung sich nur zum Teil löst. Dabei zeigen sich in verschiedenen Seris quantitative Unterschiede.

2. Bringt man die nach Zusatz von Ammonsulfat bis zur Halbsättigung ausgefallenen Niederschläge des unerhitzten und

erhitzten Serums aufs Filter, wäscht sie mit 50proz. Ammonsulfatlösung alkali- und albuminfrei, so geht der Niederschlag auf Zusatz von Wasser im ersten Falle ganz, im zweiten nur teilweise in Lösung. Die quantitative Untersuchung dieser Niederschläge (Methode siehe unten) zeigte, daß in dem auf 60° erwärmten Serum die als Globulin anzusehende Eiweißfraktion vermehrt und außerdem Alkalialbuminat aufgetreten war. Wurde das Serum nur eine halbe Stunde auf 56° erwärmt, so fehlte die Alkalialbuminatbildung, dagegen ließ sich eine deutliche Globulinvermehrung nachweisen.

Es ist hier geboten, als wichtigstes physikalisches Unterscheidungsmittel zwischen Globulin und Alkalialbuminat die Löslichkeit in verdünnten neutralen Salzlösungen, die in der geschilderten Weise geprüft werden kann, hervorzuheben. (Daß bei solchen Untersuchungen die Leichtigkeit, mit welcher Globuline namentlich bei längerem Aufenthalt in destilliertem Wasser ihre Löslichkeit in verdünnten Salzlösungen verlieren und denaturiert werden, berücksichtigt werden muß, braucht nicht näher erörtert zu werden.) Ich halte es für notwendig, diese Differenz der beiden Eiweißkörper um so mehr zu betonen, als man in der Literatur oft entgegengesetzten Ansichten begegnet. So schreibt z. B. Hammarsten in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie*): „Eine scharfe Grenze zwischen den Globulinen einerseits und den künstlichen Albuminaten andererseits läßt sich kaum ziehen. Die Albuminate sind zwar regelmäßig unlöslich in verdünnter Kochsalzlösung, doch kann man durch stärkere Alkalieinwirkung Albuminate darstellen, welche vor allem unmittelbar nach ihrer Ausfällung in Kochsalzlösung löslich sind. Umgekehrt gibt es auch Globuline, welche mit Wasser in Berührung nach einiger Zeit in Kochsalz unlöslich werden.“

Ich halte jedoch die prinzipielle Scheidung beider Körper für gerechtfertigt.

Bei strenger Beobachtung des differenten Verhaltens der beiden Eiweißgruppen gegenüber neutralen Salzlösungen gelingt die Unterscheidung derselben voneinander recht leicht**).

---

*) Auflage 4, 1899 p. 30.

**) Das Freisein des Albuminat und Globulin enthaltenden Niederschlages von Alkali vor der Vornahme der Prüfung auf seine Wasserlöslichkeit ist noch aus folgendem Grunde notwendig: Wenn man eine reine Pseudoglobulinlösung mit einem in etwas Alkali gelösten Albuminat zusammenbringt, die Mischung durch Zusatz von Ammonsulfat bis zur Halbsättigung fällt, so löst sich der Niederschlag auf Wasserzusatz zu einer opaleszenten Flüssigkeit, die selbst nach mehrstündigem Zentrifugieren keinen Niederschlag ab-

Untersucht man viele Sera in der oben geschilderten Weise, so beobachtet man bezüglich der Menge des neugebildeten Globulins und Albuminats große Unterschiede. Es kommt dabei neben dem Hitzegrade und der Dauer seiner Einwirkung auch die Tierart, von welcher das Serum stammt, in Betracht.

Tabelle I.
In 4 ccm Kaninchenserum.

	Normal			Eine Stunde auf 58° erwärmt		
	Euglobulin	Pseudoglobulin	Albumin	Euglobulin	Pseudoglobulin	Albumin
	g	g	g	g	g	g
I.	0,0207	0,0828	0,1375	0,0461	0,1665	0,0290
II.	0,0385	0,0813	0,1206	0,0680	0,1172	0,0569
III.	0,0322	0,1001	0,1210	0,0440	0,1562	0,0509
IV.	0,0369	0,0970	0,1119	0,0768	0,1040	0,0674
V.	0,0353	0,0991	0,1150	0,0699	0,1103	0,0680
VI.	0,0054	0,0657	0,1814	0,0491	0,1363	0,0718

So zeigten alle Sera nach halbstündigem Erwärmen auf 56° eine deutliche Globulinzunahme ohne Alkalialbuminatbildung. Bei einstündigem Erwärmen auf 60° aber war letztere im Pferdeserum immer, im Hundeserum oft, im Kaninchenserum seltener nachweisbar. In der vorstehenden Tabelle I sind die im gleichen Volumen (4 ccm) der unerhitzten und der eine Stunde auf 58° erwärmten Kaninchensera — in diesen Fällen fehlte jede Albuminatbildung — eintretenden Veränderungen quantitativ*) und übersichtlich zusammengestellt. Dabei ergab sich eine gewisse

sitzen läßt. Es ist dabei alkalische Reaktion notwendig. Im Gegensatz dazu wird dasselbe mit Ammonsulfat bei derselben Alkaleszenz ausgefällte Albuminat bei Abwesenheit von Pseudoglobulin durch Wasserzusatz nicht zur Lösung gebracht. Das hier erwiesene Lösungsvermögen des Pseudoglobulins für Albuminat ist zwar ein beschränktes, kommt aber bei den Schwankungen, welche die Albuminate verschiedener gleichbehandelter Sera in ihrer Löslichkeit durch reines Alkali zeigen, doch in Betracht. Man kann die genannte Löslichkeit des Albuminats willkürlich durch längeres Erwärmen (bei seiner Herstellung) mit Alkali ändern und zwar herabdrücken. Hierdurch finden die Befunde von Hammarsten[2]) über das Verhalten von Kasein bei Gegenwart von Blutserum, sowie die Ausführungen von Spiro und Porges[7]) (l. c. p. 280) ihre Aufklärung.

*) Methode Hofmeister-Pohl. Näheres Arch. f. exp. Pathol. 20, 426.

Differenz der einzelnen Sera, indem zwar alle eine Euglobulinvermehrung, jedoch nur einige eine gleichzeitige Pseudoglobulinvermehrung aufwiesen. Da, wie unten erwiesen werden wird, aus dem Albumin durch das Pseudo-Globulinstadium Euglobulin wird, so muß angenommen werden, daß in den ersteren Fällen ebensoviel Euglobulin aus dem nativen Pseudoglobulin entstand, als Pseudoglobulin aus Albumin neu gebildet worden war.

Daß Albumin in Globulin übergeführt werden kann, ist zwar mehrfach behauptet, aber noch niemals einwandfrei bewiesen worden. So erwähnen Corin und Berard[3]), daß Eieralbumin nach Erwärmen die Fähigkeit erlangt, mit Magnesiumsulfat zu fallen, ein Umstand, der an und für sich über die Natur des entstandenen Eiweißkörpers noch nicht entscheidet. Ferner hat J. Starke[4]) in einer ausführlichen Mitteilung auf Veränderungen von verdünnter Eieralbuminlösung durch Erwärmen hingewiesen. Das von ihm als Globulin bezeichnete Produkt war aber nach den entscheidenden, von ihm angegebenen Reaktionen („Unlöslichkeit in verdünnten Neutralsalzlösungen"), l. c. p. 520, kein Globulin. Bei Befolgung der von Starke geforderten Versuchsanordnung der Hitzedialyse konnte ich mich nicht überzeugen, daß der ausfallende Körper in selbst stärkerem Alkali löslich war. Vielmehr sprachen die beobachteten Eigenschaften desselben für einen koagulierten Eiweißkörper. Außerdem ist noch darauf hinzuweisen, daß sich das von Starke zu seinen Untersuchungen verwendete verdünnte Eieralbumin, sowie das kristallisierte Eieralbumin, was den Übergang in Globulin anlangt, wesentlich vom Serum, beziehungsweise kristallisiertem Serumalbumin in dem Sinne unterscheidet, als das Auftreten von Globulin unter Einhaltung der weiter unten geschilderten Versuchsbedingungen, die beim Serumalbumin immer die genannten Veränderungen herbeiführen, beim Eieralbumin nur angedeutet ist. Das letztere hat vielmehr die Neigung, sehr schnell in Albuminat überzugehen.

Da beim Erhitzen des Serums eine kombinierte Alkali- und Hitzewirkung statthat, wobei der Einfluß der beiden Komponenten wegen des verschiedenen Gehaltes des Serums an Salzen und anderen Eiweißstoffen nicht ohne weiters ersichtlich ist, ging ich daran, den beim Serum gefundenen Übergang von Albumin in Globulin und weiter in Albuminat am kristallisierten Serumalbumin bei wechselndem Alkali- und Salzgehalt zu studieren.

Das bei der Kristallisation des Serumalbumins in Lösung bleibende Conalbumin konnte durch die Alkali-Hitzewirkung nicht in Globulin übergeführt werden.

Versuche mit kristallisiertem Albumin.

Das Ausgangsmaterial zu den folgenden Versuchen bildete das nach der Hofmeisterschen Methode in der Gürber- und Kriegerschen Modifikation[5]) kristallisierte und durch Dialyse salzfrei gewonnene Serumalbumin.

In späteren Versuchen habe ich die Kristallisation des Serumalbumins folgendermaßen vorgenommen. Die alkalische Reaktion des Serums wird durch so viel $\frac{n}{10}$-Salzsäure abgestumpft, daß auf 100 ccm Serum 25 ccm der Säure kommen. Das jetzt gegen Lackmus neutral reagierende Serum wird durch neutrales Ammonsulfat auf Halbsättigung gebracht. Das Filtrat wird mit $\frac{n}{5}$ H_2SO_4 bis zur beginnenden Trübung angesäuert. Dieses Verfahren bietet gegenüber dem bisherigen folgende Vorteile: Wie mich eigene quantitative Messungen belehrten, ist nach Neutralisation des Serums die bei Halbsättigung mit Ammonsulfat ausfallende Globulinmenge größer und stellt den wahren Globulingehalt des Serums dar, da durch das Alkali des nativen Serums ein Teil des Globulins der Fällung entzogen wird. Ferner geht die Kristallisation des Albumins viel rascher vor sich, und bei richtig gewählter Menge der zugesetzten $\frac{n}{5}$-Schwefelsäure fehlen schon in der ersten Kristallisation amorphe Bestandteile oder werden auf ein Minimum reduziert.

Wird so gewonnenes Serumalbumin (das mit Baryumchlorid selbst bei längerem Stehen keine Trübung zeigt) erwärmt, so tritt schon bei ungefähr 50° Koagulation ein. Diese regelmäßig beobachtete Erscheinung steht mit den meisten Angaben, wonach das salzfreie Albumin ungerinnbar sein soll, im Widerspruch, im Einklang dagegen mit einer Angabe von Erb[6]), welcher ebenfalls auf die entgegengesetzten Angaben in der Literatur aufmerksam macht.

Das Gerinnen der Albuminlösung wurde aber hintangehalten, wenn sie vorher etwas alkalisch gemacht wurde.

Es mußte nun jene Alkalimenge festgestellt werden, bei der konstant zwar ein Übergang von Albumin in Globulin, aber keine Alkalialbuminatbildung eintritt. Für 1 bis 3proz. Albuminlösungen wurde diese in einer Natriumkarbonatlösung gefunden, die 0,0795 proz. war, somit einer $\frac{n}{66}$-Lösung entsprach. Wurde der Albuminlösung das gleiche Volumen dieser Sodalösung zugesetzt, so daß der Alkaleszenzgrad derselben jetzt einer $\frac{n}{132}$-Lauge entsprach, so konnte sie auf 60° erhitzt, ja aufgekocht werden, ohne zu koagulieren. In der ersten durch eine Stunde auf 60° erwärmten Probe fiel bei Halbsättigung mit Ammonsulfat ein dicker Niederschlag aus, welcher sich auf Zusatz von destilliertem Wasser

vollkommen klar löste, desgleichen, nachdem er durch Waschen mit 50proz. Ammonsulfatlösung vollkommen von Albumin und Alkali frei geworden war.

Ebenso ging der auf Zusatz verdünnter Essigsäure (0,01 Proz.) ausfallende Niederschlag der erhitzten Probe durch einige Tropfen physiologischer Kochsalzlösung in Lösung.

Ging man aber z. B. bei einem Eiweißgehalt von 3,5 bis 5 Proz. mit der so verwendeten Alkalimenge auf die Hälfte der Konzentration herab, so wurde die Probe beim Erhitzen auf 60° opaleszent und gerann zum Teil bei längerem Erhitzen. Das obige empirisch gefundene Verhältnis zwischen Alkali- und Eiweißmenge ändert sich insofern mit der Konzentration des Eiweißes, als es geboten ist, bei verdünnteren Albuminlösungen, z. B. solchen unter 1 Proz., mit der Alkalikonzentration noch herabzugehen. Will man aber bei derartig verdünnten Albuminlösungen eine ausgiebige Globulinbildung erzielen, so ist längeres als einstündiges Erhitzen auf 60° nötig. Trotzdem wäre es gefehlt, anzunehmen, daß die beschriebene Reaktion auch ohne Alkali von statten ginge. Erhitzt man eine reine Albuminlösung auf Temperaturen, welche unter dem Koagulationspunkt liegen, z. B. 48 bis 49°, so wird selbst nach längerer Zeit (2 bis 3 Stunden) nicht eine Spur Globulin gebildet, während unter gleichen Versuchsbedingungen nach Zusatz von etwas Alkali das Phänomen eintritt. Andererseits geht bei stärkerer Alkalikonzentration oder durch länger als 1 bis 2 Stunden währende Hitzewirkung bei 60° oder durch Überschreiten dieser Temperatur ein merklicher Teil des Albumins in Albuminat über. Es war also bei den weiteren Versuchen geboten, das einmal für gut befundene Maß der Alkali- und Hitzewirkung einzuhalten.

In bezug auf die Art des entstandenen Globulins ist folgendes zu sagen: Durch Dialyse des aus dem mit Alkali erwärmten Albumin gewonnenen und durch Waschen mit 50proz. Ammonsulfatlösung vom Albumin befreiten Halbsättigungsniederschlages fiel ein Teil aus (Euglobulin), während der Rest (Pseudoglobulin) in Lösung blieb. Der ausgefallene Anteil wurde durch wenige Tropfen verdünnter neutraler Kochsalzlösung gelöst und mit Ammonsulfalt bei Drittelsättigung ausgefällt. Ebenso stimmte auch das in Lösung verbliebene künstliche Pseudoglobulin in seinen Fällungsgrenzen gegen Ammonsulfat mit dem natürlichen überein. Wurde jedoch seine Lösung neuerdings mit dem gleichen Volumen der angegebenen Sodalösung eine Stunde auf 60° erwärmt, so gab sie jetzt bei Drittelsättigung einen Niederschlag, der auf Wasserzusatz löslich war. Ebenso ging ein nunmehr durch verdünnte Essigsäure aus-

fällbarer Niederschlag der erhaltenen Lösung durch physiologische Kochsalzlösung wasserklar in Lösung. Wenn das Verhalten der Eiweißkörper gegen Salzlösungen und die Fällungsgrenzen durch Ammonsulfat als maßgebend für die Existenz verschiedener Eiweißindividuen gelten dürfen — durch die in jüngster Zeit aus Hofmeisters Laboratorium erschienenen Arbeiten von Porges und Spiro[7]) wurde dieser Maßstab noch mehr gefestigt — so war durch mäßige Alkali-Hitzewirkung aus Albumin Pseudoglobulin, aus Pseudoglobulin Eugloblin gebildet worden. Letzteres ließ sich dann bei längerer Wärme- und Alkalieinwirkung leicht in Alkalialbuminat überführen.

Übereinstimmend mit dem künstlichen Pseudoglobulin konnte auch das native, aus normalem Pferdeserum dargestellte bei gleicher Behandlung partiell in Euglobulin übergeführt werden.

Es sei hier noch folgender Beobachtung gedacht, die für die Diskussion der Frage der Einheitlichkeit des Albumins vielleicht von Bedeutung ist, die aber noch weiterer Ausarbeitung bedarf: bestimmt man in Albuminlösung, die bei gewisser, willkürlich gewählter Konzentration an Ammonsulfat (z. B. 65 Proz. und 100 Proz. Sättigung) ausfallenden Eiweißmengen, so ergibt sich nach kurzdauernder Erhitzung ($^1/_2$ Stunde) mit obiger Alkalilösung bei 60° Zunahme der leicht fällbaren Fraktion auf Kosten der schwer fällbaren.

II.

Bei der Wichtigkeit, welche die Beobachtung der Überführbarkeit des Albumins in Globulin für die Annahme einer genetischen Beziehung dieser beiden natürlichen Eiweißkörper hat, war es noch unbedingte Forderung, zu prüfen, ob die künstlich gewonnenen Eiweiße mit den natürlich vorkommenden außer in ihrem Verhalten gegen Salze auch in ihrer chemischen Zusammensetzung übereinstimmen.

Als entscheidender analytischer Unterschied zwischen Albumin und Globulin ist der verschiedene Schwefelgehalt sichergestellt. K. A. H. Mörner[8]) hat nachgewiesen, daß in diesen beiden Eiweißkörpern des Serums der gesamte Schwefel in derselben Form und zwar in „cystinähnlicher“ gebunden ist; ferner hat man das Globulin stets schwefelärmer als das Albumin gefunden.

Diese Tatsachen, welche der Vorstellung, das Globulin des Serums sei aus dem Albumin hervorgegangen, nicht nur nicht im Wege stehen, sondern entgegenkommen, könnten andererseits auch das oben genannte differente Verhalten des Eieralbumins, in welchem — wie ebenfalls Mörner gezeigt hat — nur ein kleiner Teil des Schwefels als Cystinschwefel gebunden ist, erklären.

Es ergab sich daher behufs Identifizierung des künstlichen mit dem natürlichen Globulin die Aufgabe, den Schwefelgehalt beider zu vergleichen.

Bei den quantitativen Bestimmungen des Schwefels ging ich genau nach den Vorschriften Mörners vor (l. cit. S. 209). Um sicher zu sein, die Methode vollkommen zu beherrschen, machte ich zunächst einige Kontrollbestimmungen am kristallisierten Pferdeserumalbumin, und fand in gut übereinstimmenden Parallelproben als Mittelwert 2,18 Proz. S. (Mörner fand 2,15 Proz. S.)

Dieser Wert bedarf nach Mörner einer Richtigstellung. Da Mörner nämlich nach dem Ausziehen des Albumins mit Ammoniak einen Verlust von 0,42 Proz. S zu verzeichnen hatte, nimmt er den dann übrig bleibenden 1,73 Proz. als wirklichen Schwefelgehalt des Albumins an. „Dieser Versuch scheint es sicher zu stellen, daß die Schwefelsäure nicht organisch gebunden ist, sondern eine salzartige Verbindung mit dem Albumin eingeht. Diese Schwefelsäure stammt also wahrscheinlich von den Sulfaten her, welche bei der Darstellung des Albumins gebraucht wurden."

Um zu erfahren, wie viel Schwefel durch Behandeln mit Ammoniak aus dem von mir benutzten Albumin beseitigt wird, wurde ein Teil desselben so lange mit Ammoniakwasser ausgezogen, bis das Waschwasser mit Baryumchlorid, das mit Salzsäure angesäuert war, keine Trübung mehr gab. Durch das Waschen mit Ammoniakwasser war etwas Eiweiß in Lösung gegangen. Das vom Filter genommene und auf konstantes Gewicht gebrachte Albumin (0,1356 g und 0,5172 g) enthielt noch 1,95 Proz. bzw. 2,01 Proz., im Mittel also 1,98 Proz. Schwefel. Die Differenz der Schwefelwerte gegenüber dem oben angeführten, mit Ammoniak nicht ausgezogenen Albumin betrug daher nur 0,20 Proz. Bei einem anderen kristallisierten Pferdeserumalbumin, dessen Schwefelgehalt ein recht hoher, nämlich im Mittel 2,61 Proz. war, erwies sich derselbe nach dem Ausziehen mit Ammoniak um 0,305 Proz. geringer. Im allgemeinen sei noch bemerkt, daß die Albumine und auch die Globuline verschiedener in derselben Weise dargestellten und untersuchten Pferdesera in ihrem Schwefelgehalt erhebliche Differenzen aufwiesen.

Zur Darstellung des künstlichen Globulins wurde das durch Kristallisation gewonnene und gereinigte und durch Dialyse vom Sulfat befreite Albumin mit dem gleichen Volumen der 0,079proz. Sodalösung durch $1^1/_2$ Stunden auf 60° im Wasserbad erhitzt. Nach dem Ausfällen des gebildeten Globulins mit Ammonsulfat — auf Abwesenheit etwa vorhandenen Albuminats wurde in der oben geschilderten Weise geprüft — und Reinigen desselben durch Waschen mit 50proz. Ammonsulfatlösung, wurde es koaguliert, mit heißem Wasser vom Sulfat vollkommen befreit, mit Alkohol und Äther behandelt, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Die Schwefelzahlen sind das Mittel aus zwei Bestimmungen. (Siehe Tabelle auf folgender Seite.)

Zu dem Präparat III sei bemerkt, daß auch das aus dem betreffenden nativen Pferdeserum dargestellte Pseudoglobulin und ebenso das Euglobulin durch hohe Schwefelwerte auffielen. Das Pseudoglobulin enthielt im Mittel 1,50 Proz. S, das Euglobulin 1,57 Proz. S. In anderen untersuchten Fällen schwankte der Schwefelgehalt des nativen Globulins zwischen **1,1** Proz. und **1,4** Proz.

Pferdeserum	Nr. I	Nr. II	Nr. III
S-Gehalt des Albumins	2,19 Proz.	2,19 Proz.	2,61 Proz.
S-Gehalt des künstl. Pseudoglobulins + Euglobulins	1,19 Proz.	1,35 Proz.	
S-Gehalt des künstl. Pseudoglobulins			1,75 Proz.
S-Gehalt des künstl. Euglobulins			1,66 Proz.

In Übereinstimmung mit Mörner, welcher allerdings nicht die Ammonsulfatfällung zur Trennung der beiden Globuline benutzte, konnte ich im Schwefelgehalt des Eu- und Pseudoglobulins keine nennenswerten Unterschiede finden.

Die künstlichen Globuline stimmten somit in ihrem Schwefelgehalt völlig mit den natürlichen überein.

Auch in folgenden Versuchen konnte eine Übereinstimmung zwischen künstlichem und nativem Globulin konstatiert werden.

Das aus einem nativen Pferdeserum durch Verdünnen und Ansäuren mit verdünnter Essigsäure ausfallende Globulin (Freunds Essigsäurekörper) hatte einen Schwefelgehalt von 1,21 Proz. Der Schwefelgehalt des kristallisierten, aus demselben Serum stammenden Albumins betrug 1,93 Proz. und das aus diesem Albumin nach Alkali-Hitzewirkung durch sehr verdünnte Essigsäure ausgefallene Globulin (künstlicher Essigsäurekörper) wies einen Schwefelgehalt von 1,44 Proz. auf. Die angeführten Zahlen sind das Mittel zweier Parallelproben.

In ähnlicher Weise konnte ein künstlicher Essigsäurekörper mit einem Schwefelgehalt von 1,35 Proz. gewonnen werden, als nach Ausfällung des nativen Essigsäurekörpers, dessen Schwefelgehalt 1,39 Proz. im Mittel betrug, das Filtrat desselben der Alkali-Hitzewirkung unterworfen und mit verdünnter Essigsäure zur Fällung gebracht wurde.

Aus den genannten Untersuchungen geht wohl mit Sicherheit hervor, daß zwischen künstlichem und natürlichem Globulin nicht nur in bezug auf die physikalischen Reaktionen, wie Wasserunlöslichkeit, Salzlöslichkeit und Fällungsgrenzen, sondern auch — und darauf soll besonders Gewicht gelegt sein — im prozentischen Schwefelgehalt Übereinstimmung herrscht.

Ob der weitere von L. Langstein[9]) festgestellte qualitative Unterschied zwischen den Kohlehydratgruppen des Serumalbumins und Serumglobulins auch für künstliche Globuline Gültigkeit hat, konnte, zumal die ausführliche Mitteilung der Untersuchung über „die Kohlehydrate des Serumglobulins" erst vor einigen Tagen erschienen ist, andererseits die Beschaffung der zu den Untersuchungen erforderlichen großen Mengen künstlichen Globulins derzeit undurchführbar war, noch nicht geprüft werden.

Ferner kann und soll erst nach Veröffentlichung der Angaben Gümbels[*]) über die Verteilung des Stickstoffs im Globulinmolekül ein darauf bezüglicher Vergleich des natürlichen mit dem künstlichen Globulin durchgeführt werden.

Die Differenz in den Koagulationstemperaturen des natürlichen Albumins und Globulins konnte auch bezüglich des künstlichen Globulins konstatiert werden. Bei Beobachtung gleicher Versuchsbedingungen, d. i. gleicher Eiweiß- und Salzkonzentration hatte eine Albuminlösung einen niedrigeren Koagulationspunkt als das aus ihr dargestellte Globulin. Zahlen anzuführen unterlasse ich, da die Koagulationstemperatur von Globulinlösungen nach Eiweiß- und Salzkonzentration schwankt.

Schließlich sei erwähnt, daß das „biologische" Verhalten des künstlichen Globulins jenem des nativen entsprach. Es gab nämlich das Serum der mit subkutanen Injektionen von künstlichem Globulin, ebenso wie der mit natürlichem Globulin behandelten Kaninchen einen stärkeren Niederschlag mit Globulin als mit Albumin.

Es schien von Interesse zu prüfen, ob auch bei Lebenstemperatur ein Übergang des Albumins in Globulin eintritt. Die an Seris verschiedener Tiere angestellten quantitativen Versuche zeigten, daß nach 24stündiger Digestion derselben bei 37 bis 38° kein Albumin in Globulin überging. Die gleichen negativen Resultate hatten auch die an reinen mit der 0,079 proz. Sodalösung zu gleichen Teilen verdünnten Albuminlösungen angestellten Versuche. Dagegen tritt das Phänomen auf bei einer auf Blutalkalescenz (0,4 Proz. Na_2CO_3) gebrachten und 8 Stunden bei 38° gehaltenen Lösung von kristallisiertem Serumalbumin; worauf dieser Unterschied zwischen Serum und Eiweißlösungen beruhen könnte erhellt aus dem Folgenden.

III.

Bevor eine Deutung des Zustandekommens der beobachteten Überführung von Albumin in Globulin versucht werden kann, bedarf es noch vielfacher Vervollständigung unserer Kenntnisse.

Nachdem die Gegenwart von freiem Alkali als unbedingte Voraussetzung der Umwandlung erkannt worden war — die Überführung ist somit eine Funktion der Hydroxylionen —, wurde zunächst untersucht, ob sich die Energie der Reaktion mit wechselnden Basen*) ändert.

Es wurden Lösungen von K_2CO_3, $(NH_4)_2CO_3$, Li_2CO_3, $NaHCO_3$, $NaOH$, KOH, Na_2HPO_4, K_2HPO_4, welche einer 0,079 proz.

*) Auch organische Basen, wie Anilin, Pyridin führen Albumin in Globulin über.

Na_2CO_3-Lösg. äquivalent waren, hergestellt (je 10 ccm dieser Lösungen werden durch 1,5 ccm einer $\frac{n}{10}$-HCl neutralisiert), und auf ihr Überführungsvermögen von Albumin in Globulin untersucht.

Je 12 ccm einer reinen Albuminlösung wurden mit 12 ccm einer dieser Lösungen zusammengebracht und in einem auf 60° gestellten Wasserbade eine Stunde lang belassen. Alle Proben wurden zur selben Zeit und gleich lange erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösungen wurde zu je 20 ccm der Mischung die gleiche Menge kaltgesättigter neutraler Ammonsulfatlösung zugesetzt. Nach dem Absetzen der Niederschläge wurden dieselben auf ein gewogenes Filter gebracht, mit 50proz. Ammonsulfatlösung albuminfrei gewaschen, bei 100° koaguliert, mit heißem Wasser vom Sulfat befreit, mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und gewogen.

Die in Tabelle II zusammengestellten Ergebnisse dieser Versuchsreihen lassen folgende Schlüsse zu:

1. Die Menge des gebildeten Globulins hängt bei gleichen Versuchsbedingungen von der Konzentration der Albuminlösung ab, indem aus konzentrierten Lösungen verhältnismäßig mehr Globulin gebildet wird.

Tabelle II.

In 10 ccm Albuminlösung g		Lithium-	Ammonium-	Natrium-				Kalium-		
Albumin		Karbonat	Karbonat	Hydroxyd	Karbonat	Phosphat	Bikarbonat	Hydroxyd	Karbonat	Phosphat
0,3452	Nach einstündigem Erwärmen auf 60° gebildetes Globulin	0,2692	0,2701	0,2956	0,2662 = 77%	0,2718	0,2661	Albuminat	0,2717	0,2664
0,2492		0,1709	0,1716	0,1920	0,1701 = 68,2%	0,1717		Albuminat	0,1729	
0,1246		0,0590	0,0562	0,0909	0,0615 = 49,3%	0,0598	0,0597	Albuminat	0,0660	0,0583

2. Die Karbonate, Bikarbonate, Phosphate der Alkalimetalle wirken gleich stark, schwächer aber als die Hydroxyde.

3. Auch das Kation ist dabei von Bedeutung, was z. B. in dem ungleichen Verhalten des Kaliumhydroxyds und Natriumhydroxyds zum Ausdruck kommt.

War die Annahme einer Wirkung freier Hydroxylionen bei der Überführung von Albumin in Globulin richtig, so mußte auf diesen Vorgang die Anwesenheit von Salzen, welche die Dissoziation

zurückdrängen, hemmend wirken. In der Tabelle Nr. III sind darauf bezügliche Versuchsergebnisse zusammengestellt. Aus diesen geht hervor:

1. Die neutralen Salze wirken hemmend auf die Überführung von Albumin in Globulin, und zwar mit ansteigender Konzentration stärker;

2. die stärkste hemmende Wirkung haben die Ammonsalze; schwächer als diese wirken die Nitrate und noch schwächer die Chloride;

3. die Hemmung der Globulinbildung durch Salze hängt von der Eiweißkonzentration ab, indem sie bei konzentrierten Eiweißlösungen viel stärker als bei verdünnten in Erscheinung tritt; bei einer stark verdünnten Albuminlösung ist (wie im dritten Falle) ein hemmender Einfluß durch Salze, wenn von den Ammonsalzen abgesehen wird, nicht oder nur in geringem Maße konstatierbar.

Tabelle III.

Globulinbildung unter dem Einfluß von Salzlösungen, welche einer 3proz. bzw. 6proz. Kochsalzlösung äquimolekular waren.

In 10 ccm Lösung gr Albumin	Menge des aus 10 ccm Albuminlösung + 10 ccm Na_2CO_3-Lösung durch einstündiges Erwärmen auf 60° gebildeten Globulins		Ammonium-		Natrium-		Kalium-	
			Chlorid	Nitrat	Chlorid	Nitrat	Chlorid	Nitrat
0,3452	0,2662 = 77,1 %	3 %	Spur	Spur	0,2373 = 68,7 %	0,0798 = 23,1 %	0,2240	0,0902
		6 %	—	—	0,1003 = 29 %			
0,2493	0,1701 = 68,2 %	3 %	Spur	Spur	0,1400 = 56,1 %	0,1252 = 50,2 %	0,1450	0,1312
		6 %	—	—	0,1131 = 45,3 %	0,0342 = 13,7 %	0,1150	0,0437
0,1573	0,0530 = 33,6 %	3 %	Spur	Spur	0,0595 = 37,8 %	0,0504 = 32,0 %		0,0504
		6 %	—	—	0,0540 = 34,2 %	0,0439 = 27,9 %		0,0392

Neben dem in vorstehender Tabelle angeführten Chlorid und Nitrat wirkten Ammoniumbromid, -jodid und -sulfat in gleicher Weise hemmend. Um eine nähere Vorstellung von dem Umfang der Hemmung durch Salze in ihrer Abhängigkeit von den absoluten Mengen derselben zu geben, mögen noch folgende zwei Versuchsreihen (Tabelle IV und V) hier Platz finden. Die Versuche zeigen den

Tabelle IV.

Menge des aus 10 ccm Albuminlösung (0,2707 g enthaltend) + 10 ccm $(NH_4)_2CO_3$-Lösung (0,075 %) durch einstündiges Erwärmen auf 60° gebildeten Globulins	Unter dem Einfluß von NH_4Cl gebildetes Globulin		
	Auf ein $(NH_4)_2CO_3$-Molekül entfallen NH_4Cl-Moleküle	NH_4Cl-Konzentration in Proz.	
0,1818 = 67,1 %	29,8	0,93 %	0
	24,0	0,75 %	Spur
	17,9	0,56 %	0,0533 = 19,6 %
	11,8	0,37 %	0 0896 = 33 %
	5,7	0,18 %	0,1280 = 47,3 %
	0,57	0,018 %	0,1644 = 60,7 %

Tabelle V.

Menge des aus 10 ccm Albuminlösung (0,2707 g enthaltend) + 10 ccm Na_2CO_3-Lösung (0,079 %) durch einstündiges Erwärmen auf 60° gebildeten Globulins	Unter dem Einfluß von NaCl gebildetes Globulin		
	Auf ein Na_2CO_3-Molekül entfallen NaCl-Moleküle	NaCl-Konzentration in Proz.	
0,1870 = 69,0 %	143	6,25 %	0
	123	5,36 %	Spur
	102	4,46 %	0,0525 = 19,3 %
	82	3,57 %	0,0743 = 27,4 %
	61	2,67 %	0,0905 = 33,4 %
	41	1,78 %	0,1522 = 56,2 %
	20	0,89 %	0,1853 = 68,4 %

Einfluß von Chlornatrium auf Natriumkarbonat- und von Chlorammonium auf Ammoniumkarbonatwirkung.

Die gewählten Salzkonzentrationen sind, absteigend angeordnet, Multipla der zur Digestion verwendeten $\frac{1}{132}$-n-Karbonatlösungen.

Aus den angeführten Werten ergibt sich, daß Chlorammonium sich einem gleichionigen Karbonat gegenüber ebenfalls leistungsfähig erweist, quantitativ jedoch schon in weit schwächeren Konzentrationen hemmend wirkt als Chlornatrium auf Natriumkarbonat.

Durch diese konstante Hemmungswirkung*) stehen die Ammoniaksalze bei der chemischen Reaktion der Globulin-

*) Ein Analogon für unser Phänomen ist vielleicht die von Arrhenius (Zeitschr. f. physik. Chemie 1903, 44, 7) gemachte Beobachtung der Hemmung der hämolytischen Wirkung des Ammoniaks durch Ammoniaksalze.

bildung im Gegensatz zu ihrer Rolle beim physikalischen Phänomen der Beeinflussung der Salzfällung von Eiweißkörpern [s. Pauli[11])].

Es besteht somit, kurz zusammengefaßt, folgende merkwürdige Beziehung zwischen Alkalikarbonaten und Ammonsalzen. Während beim Erhitzen auf 60° 1. Albumin allein koaguliert, 2. Albumin + Chloramonium ebenfalls koaguliert, 3. Albumin + Karbonat in Globulin übergeht, wird 4. Albumin + Karbonat + Chlorammonium nicht verändert. Dialysiert man in letzterem Falle nach der Digestion das Karbonat und Chlorammonium weg, so zeigt das Albumin seine ursprünglichen Eigenschaften in unvermindertem Maße, und ist insbesonders mit Karbonat allein in Globulin überführbar. Es besteht somit im Falle 4 eine Art Gleichgewichtszustand zwischen entgegengesetzten Funktionen des Hydroxyls: einerseits ist die Koagulation verhindert, was auf freie Hydroxylwirkung zurückzuführen ist, andererseits ist deren Vermögen, Albumin anzugreifen, durch Chlorammonium aufgehoben.

Wie beeinflussen Nichtelektrolyten den Vorgang der Globulinbildung? In dieser Richtung habe ich bisher nur Zucker und Harnstoff in Lösungen kristallisierten Albumins untersucht. Sie zeigten entgegengesetztes Verhalten. Während Zucker eine geringe Hemmung ausübte, hat der Harnstoff, wie aus Tabelle VI hervorgeht eine fördernde Wirkung.

Tabelle VI.

Menge des aus 10 ccm Albuminlösung (0,2707 g enthaltend) + 10 ccm Na_2CO_3-Lösung (0,079 %) durch einstündiges Erwärmen auf 60° gebildeten Globulins	Unter dem Einfluß von $\overset{+}{U}$ gebildetes Globulin		
	Auf ein Na_2CO_3-Molekül entfallen $\overset{+}{U}$-Moleküle	$\overset{+}{U}$-Konzentration in Proz.	
0,1798 = 66,4 %	4,02	0,18 %	0,1774 = 65,5 %
	24,8	1,11 %	0,1821 = 67,2 %
	45,8	2,05 %	0,1910 = 70,5 %
	66,6	2,98 %	0,1963 = 72,5 %
	87,2	3,90 %	0,2072 = 76,4 %
Menge des aus 10 ccm Albuminlösung (0,2707 g enthaltend) + 10 ccm Na_2CO_3-Lösung (0,4 %) (Blutalkaleszenz) durch achtstündiges Erwärmen auf 38° gebildeten Globulins			Unter dem Einfluß von $\overset{+}{U}$ (bei 38°) gebildetes Globulin
0,0523 = 19,3 %	87,2	3,90 %	0,1247 = 46,0 %

Die naheliegende Vermutung, daß diese fördernde Wirkung auf Karbonatbildung durch Zersetzung des Harnstoffs beruhen könnte, begegnet der Schwierigkeit, daß Harnstoffzersetzung bei der eingehaltenen niedrigen Temperatur nicht beobachtet wird.

Übertrage ich die Erfahrungen dieses III. Abschnittes vorliegender Arbeit auf den lebenden Warmblüterorganismus, indem bei 0,4 Proz. Na_2CO_3-Alkaleszenz stets nur ein Teil des Gesamteiweißes als Globulin kreist, so scheint es, als ob die globulinbildende Wirkung des Alkalis durch die Blutsalze eine Regulierung resp. Hemmung erfahre.

Wenn auch der Umfang der beschriebenen Reaktion der Umwandlung des Albumins zu Globulin in ihrer Abhängigkeit von Konzentration, Zeit, Basis, Temperatur und Salzgehalt festgestellt worden ist, so müssen zur Aufklärung des zugrunde liegenden Vorgangs noch weitere eingehende Versuche angestellt werden: in der Schwefelabspaltung allein ist kaum das Entscheidende zu vermuten. Unabhängig von der zukünftigen Auffassung der Reaktion erscheint auch die Schlußfolgerung aus dem Mitgeteilten, daß die Bindung der Cystin- bzw. Thiomilchsäuremoleküle im Albumin keine gleichartige ist, daß sich vielmehr in diesem leichter und schwerer abspaltbare Schwefelkomplexe befinden.

Prag, Juli 1903.

Literaturverzeichnis.

1) Baumgarten, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 43, 1902.

2) Hammarsten, Ergebnisse d. Physiologie 1, 344. Über die Eiweißstoffe des Blutserums.

3) Corin und Berard, Corin und Ansiaux, cit. nach Malys Jahresbericht 18, 13, 22, 92.

4) J. Starke, Zeitschr. f. Biolog. S. 494 (1900).

5) Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, S. 140 (1900).

6) Erb, Zeitschr. f. Biolog. 41, 314 (1901).

7) Porges und Spiro, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 1902.

8) K. A. H. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chemie 34, 207 (1902).

9) L. Langstein, a) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 259. b) Sitzungsbericht d. kaiserl. Akademie d. Wissenschaften in Wien. Mathem.-naturw. Klasse 112, Abt. IIb. Mai 1903.

10) Hofmeister, Ergebnisse d. Physiologie 1, 777. Über Bau u. Gruppierung der Eiweißkörper.

11) Pauli, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 225.

XLIV.

Über Blutveränderungen nach Eiweißinjektionen.

Von Dr. **Leopold Moll,** Assistent des Instituts.

Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag.

In einer vorhergehenden Arbeit[1]) wurde der Nachweis geliefert, daß durch Erwärmen des Serums auf jene Temperaturen, bei welchen die bekannten Veränderungen an den Immunkörpern oder -kräften desselben (Inaktivierung) vor sich gehen, auch solche an den Eiweißkörpern, und zwar Umwandlungen der schwerer in die leichter fällbaren (der Albumine in Globuline) statthaben. Hieran anknüpfend stellte ich mir die Aufgabe, festzustellen, ob nicht auch im Verlaufe eines Immunisierungsvorganges die Eiweißkörper des Serums im lebenden Blute eine quantitative Veränderung erfahren.

Schon jetzt liegt eine Reihe von gelegentlichen Beobachtungen vor, aus denen hervorgeht, daß mit der Immunisierung Veränderungen des Blutes, und zwar der Eiweißkörper desselben, einhergehen. So hat Seng[2]) die Angabe gemacht, daß im Diphtherieheilserum Globuline in vermehrter Menge nachweisbar seien. Atkinson[3]) nimmt einen direkten Zusammenhang zwischen der antitoxischen Kraft des Serums und dem Globulin an. Joachim[4]) untersuchte das Serum eines Pferdes vor und nach der Immunisierung mit Diphtherietoxin und fand eine sehr bedeutende Zunahme des Gesamtglobulins auf Kosten des Albumins. In derselben Arbeit, welche erst vor kurzem und zu einer Zeit erschien, als meine Untersuchungen bereits längst abgeschlossen waren, ist ferner festgestellt worden, daß die Vermehrung des Globulins nicht das Pseudoglobulin, an welchem, wie E. P. Pick[5]) gezeigt hat, die wirksame Substanz haftet, sondern das Euglobulin betrifft. „Inwieweit hier individuelle Verschiedenheiten in der Zusammensetzung des Blutserums von Pferden mitspielen“ und ob der genannte Befund ein allgemeiner ist, müßte weiteren

Untersuchungen anheimgestellt bleiben. Schließlich fand Jakoby[6]), daß im Serum des Rizin-Immunblutes „die Euglobulinfraktion sehr groß ist und eine reichliche Quantität wasserlöslichen Globulins (Pseudoglobulins) enthält.“

Allen diesen mehr zufälligen Befunden kann erst dann völlige Wertschätzung zuteil werden, wenn durch eine systematische Untersuchung ihr regelmäßiges Auftreten und ihr Zusammenhang mit gewissen, bestimmten Immunitätsreaktionen sichergestellt erscheint. Ich wählte von letzteren die einer Messung zugängliche Präzipitinreaktion. Faßt man die Bildung von „Präzipitinen“ im Blut von mit Eiweißinjektionen behandelten Tieren als Ausdruck von Gegenreaktionen des Organismus auf, so ist es wohl gestattet, diesen Vorgang mit anderen Immunisierungsvorgängen (Antikörperbildung, Antitoxinerzeugung) in eine Reihe zu stellen. In diesem Sinn ist unter Immunserum im folgenden stets das Serum derartig behandelter Tiere gemeint.

I.

Als Versuchstiere dienten Tiere (Kaninchen, Hunde), deren Sera im normalen Zustand auf ihren Globulin- und Albumingehalt*) untersucht worden waren. Erst nachdem sich die Tiere von dem zu dieser Untersuchung notwendigen Aderlaß (40 ccm) erholt hatten, wurde mit den subkutanen Eiweißinjektionen begonnen, und damit durch sechs Wochen (eine Injektion wöchentlich) fortgefahren. Vorher hatte ich mich am Kontrolltiere überzeugt, daß schon 24 Stunden nach einem derartigen Aderlaß die Eiweißkörper des Serums ihrer Menge und Verteilung nach dieselben waren wie vorher. Acht Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere verblutet. Die Sera gaben mit den zu den Injektionen verwendeten Eiweißkörpern deutliche Niederschläge. Dieselben waren keineswegs spezifisch. Auch Rostoski[7]) konnte eine Spezifität der Niederschläge nicht beobachten. Nur insofern konnte ich eine gewissermaßen relative Spezifität nachweisen, als die Immunsera mit den zur Injektion verwendeten Eiweißkörpern einen stärkeren Niederschlag ausfallen ließen, als mit anderen Eiweißkörpern. Abweichend verhielten sich die mit Wittepepton behandelten Tiere, indem ihre Sera mit demselben ein sehr kleines Präzipitat, mit anderen Eiweißkörpern jedoch recht deutliche Niederschläge gaben. Ähnlich verhielten sich auch mit Leim behandelte Tiere.

*) Die Angaben über das zur quantitativen Bestimmung dieser Eiweißkörper eingeschlagene Verfahren nach Hofmeister-Pohl, s. Arch. f. experim. Path. **20**.

Dagegen gaben die mit Globulin (sowohl natürlichem, wie künstlichem) behandelten Tiere Sera, welche mit Globulinen stärkere Präzipitate als mit Albuminen gaben.

Auch Umber[8]) konnte eine absolute Spezifität für einzelne Eiweißkörper nicht konstatieren*).

Die Resultate meiner Bestimmungen sind in nebenstehender Tabelle verzeichnet. Aus derselben geht hervor, daß mit subkutanen Injektionen von Pferdeserum behandelte Tiere das gemeinsame und gesetzmäßige Phänomen der Globulinvermehrung bei gleichbleibendem Eiweißgehalt des Serums zeigen. Dasselbe Verhalten boten ferner die Sera der mit den einzelnen rein dargestellten Eiweißkörpern des Serums oder mit anderen Eiweißkörpern behandelten Tiere. (Als Conalbumin Nr. X ist analog dem so benannten Körper des Eierklars der bei der Kristallisation des Pferdeserumalbumins in Lösung bleibende bezeichnet.)

Das Tier Nr. VI, das ebenso wie das fünfte mit subkutanen Injektionen von reinem Pseudoglobulin behandelt worden war, verhielt sich in zweifacher Hinsicht abweichend. Erstens hatte es schon im normalen Serum viel mehr Globuline (fast die Hälfte des Gesamteiweißes) und zweitens war nach der Immunisierung keine Globulinvermehrung nachweisbar. Die Tatsache, daß trotz längerer Immunisierung der Globulingehalt des Serums über eine gewisse Grenze hinaus nicht gesteigert werden kann, spricht für einen uns derzeit noch unerklärten Regulierungsvorgang im Organismus.

Die Vermehrung des Halbsättigungsniederschlages im Immunserum könnte nun sämtliche in ihm enthaltenen Eiweißkörper betreffen, das sind das Pseudoglobulin, das Euglobulin, das Fibrinoglobulin und ein Nucleproteid. Das letztere kommt bei den in Verwendung gezogenen kleinen Serummengen nicht in Betracht. Den Hauptanteil an der Vermehrung des Halbsättigungsniederschlages betrifft das Pseudoglobulin und Euglobulin. Das Euglobulin ist verhältnismäßig meist stärker vermehrt als das Pseudoglobulin, wiewohl das letztere im normalen wie im Immunserum an Masse weit überwiegt.

*) Die ausführliche Literatur über die Frage der Spezifität der Präzipitinreaktion findet sich in einer in letzter Zeit erschienenen Arbeit „Über Immunität gegen Eiweißkörper“ von L. Michaelis und C. Oppenheimer. (Archiv für Physiologie 1902, S. 341.)

Tabelle.

Immunisierungsmaterial	Tier		Gewicht des Tieres vor und nach der Immunisierung g	g	Gesamt-Globulin in 4 ccm Normalserum g	Gesamt-Eiweiß in 4 ccm Normalserum g	Gesamt-Globulin in 4 ccm Immunserum g	Gesamt-Eiweiß in 4 ccm Immunserum g
Pferdeserum	I.	Kaninchen	2680	2250	0,0923	0,2473	0,1664	0,2503
Pferdeserum	II.	Kaninchen	2730	2210	0,0848	0,2519	0,1477	0,2392
Pferdeserum	III.	Kaninchen	2280	1850	0,0869	0,2551	0,1570	0,2394
Euglobulin aus Pferdeserum	IV.	Kaninchen	2820	2600	0,1086	0,2641	0,1577	0,2678
Pseudoglobulin a. Pferdeserum	V.	Kaninchen	3300	2800	0,0922	0,2574	0,1444	0,2537
Pseudoglobulin a. Pferdeserum	VI.	Kaninchen	2910	2750	0,1321	0,2752	0,1325	0,2552
Künstliches Globulin, dargestellt aus krist Serumalbumin	VII.	Kaninchen	2315	1800	0,0832	0,2488	0,1303	0,2564
Kristallisiertes Pferdeserumalbumin	VIII.	Kaninchen	2900	1840	0,0557	0,2165	0,1371	0,2187
Kristallisiertes Pferdeserumalbumin	IX.	Kaninchen	2700	1940	0,0512	0,2472	0,1183	0,2271
Conalbumin aus Pferdeserum	X.	Kaninchen	2820	2000	0.0968	0,2260	0,1497	0,2390
Alkalialbuminat, dargestellt a. Pferdeserum	XI.	Kaninchen	2360	1850	0,0939	0,2370	0,1321	0,2557
Alkalialbuminat, dargestellt a. Pferdeserum	XII.	Kaninchen	2200	2000	0,0894	0,2481	0,0798	0,2316
Kaninchenserum	XIII.	Kaninchen	2560	2200	0.1236	0,2346	0,1109	0,2338
Kaninchenserum	XIV.	Kaninchen	2700	2560	0,0987	0,2531	0,1035	0,2485
Ziegenserum	XV.	Kaninchen	2650	2080	0,0827	0,2480	0,1431 n. 5 Wochen 0,1203	0,2567 n. 5 Wochen 0,2403
Ziegenserum	XVI.	Kaninchen	2500	1980	0.0690	0,2454	0,1260	0,2496
Eieralbumin 60 ccm	XVII.	Kaninchen	3000	2700	0,1020	0,2482	0,1381	0,2460
Milch	XVIII.	Kaninchen	2200	1950	0,1021	0,2327	0,1548	0,2451
Globulin aus Pferdeserum	XIX.	Hund	6620	6650	0,0773	0,2656	0,1267	0,2707
Globulin aus Pferdeserum	XX.	Hund	10800	9250	0.1487	0,3091	0,1784	0,2784
Wittepepton 60 ccm (2 proz.)	XXI.	Kaninchen	2030	1040	0,0621	0,2251	0,1114	0,2424
Gelatine 60 ccm (5 proz.)	XXII.	Kaninchen	2650	1620	0,1030	0,2553	0,1407	0,2695
Gelatine 45 ccm (10 proz.)	XXIII.	Hund	9670	9020	0,0692	0,2279	0,1255	0,2314
NaCl (0,85 proz.)	XXIV.	Kaninchen	2350	2300	0,0837	0,2437	0,0921	0,2513

Im Drittelsättigungsniederschlag ist noch neben dem Euglobulin das schon bei 28,5 Proz. Sättigung ausfallende Fibrinoglobulin enthalten. Im normalen Serum ist dieses in so minimaler Menge vorhanden, daß es bei den geringen verwendeten Serummengen füglich übergangen werden kann. Mit steigendem Fibrinogengehalt des Blutes aber würde es im Serum ebenfalls vermehrt auftreten, gleichgültig, ob es bei der Gerinnung durch hydrolytische Spaltung aus dem Fibrinogen hervorgegangen oder in Lösung gebliebenes Fibrinogen ist. In der Tat lehrten quantitative Messungen, die nach den von Reye[9]) in Hofmeisters Laboratorium ausgearbeiteten Angaben vorgenommen wurden, und deren Einzelheiten tabellarisch an anderem Orte zusammengestellt sind, daß im Verlaufe der Immunisierung der charakteristische Eiweißkörper des Plasmas, das Fibrinogen, gegen die Norm zunimmt*). Das somit in diesen Fällen auch im Serum vermehrt vorhandene Fibrinoglobulin wurde nicht isoliert, sondern in dem Gesamtglobulin mitbestimmt.

II.

Wie schon erwähnt, sollte die Entscheidung der Frage, ob die nach Eiweißinjektionen stets eintretenden, eben beschriebenen Blutveränderungen mit einem Immunisierungsphänomen in ursächlichem Zusammenhange oder in Parallele stehen, durch Analyse der nach Eiweißinjektionen (Immunisierung gegen Eiweiß) auftretenden Präzipitinreaktion untersucht werden. Es mußte daher zunächst klargestellt werden, ob die vermehrten Globuline an der Niederschlagsbildung beteiligt sind oder nicht.

Es galt zu entscheiden, ob das Präzipitat, d. i. der Niederschlag, welchen Immunserum und Eiweiß zusammengebracht geben, aus dem Immunserum oder aus dem zugesetzten Eiweiß oder aus beiden stammt.

Über diesen Punkt herrschen verschiedene Anschauungen.

Die verbreitetste ist die, daß das Immunserum durch einen in ihm neu entstandenen fermentartig wirkenden Immunkörper (Präzipitin der Autoren) das korrespondierende Eiweiß aus seiner Lösung ausfälle [v. Dungern[10])].

*) Meine Beobachtungen über die Fibrinogenvermehrung nach Eiweiß- und Leiminjektionen sind in einem „Die blutstillende Wirkung der Gelatine" betitelten Artikel (Wiener klinische Wochenschrift 1903, Nr. 44) niedergelegt. Siehe auch dort den Nachweis eines Parallelismus zwischen Fibrinogen- und Leukocytengehalt des Blutes.

Gegen diese Ansicht sprechen folgende Befunde.

Zunächst wird übereinstimmend [Uhlenhuth[11]), Wassermann und Schütze[12]), Stern[13])] berichtet, daß die zur gerichtlich medizinischen Blutuntersuchung hergestellten Präzipitinsera mit einer Spur des zu untersuchenden Blutes, z. B. noch oft bei 50000 facher Verdünnung desselben Niederschläge gaben, die somit schon der Masse nach unmöglich aus dem verwendeten Blute stammen konnten.

Ferner konnte E. P. Pick[14]) aus Kulturfiltraten, die mit den entsprechenden Immunseris die Krausschen Niederschläge gaben, zwei Körper darstellen, welche bis auf die Biuret- und Millonsche Reaktion — im zweiten Falle, Bakterienkoagulin K, fehlte auch die letztere — keine Eiweißreaktionen mehr zeigten, dagegen mit den Immunseris deutliche Niederschläge gaben, sodaß „in dem Bakterienkoagulin das chemisch aktive Agens, in dem Serumkoagulin der passive Komplex, das wesentliche Substrat der Reaktion“ zu suchen sei.

„Linossier und Lemoine[15])*) haben die Proportionsverhältnisse zwischen beiden Substanzen, unter deren Zusammenwirkung es zur Niederschlagsbildung kommt, ebenfalls genauer studiert und gleichfalls gefunden, daß z. B. 25 Teile eines aktiven Kaninchenserums durch einen Teil Menschenserum ihrer ganzen präzipitierenden Körper beraubt werden, während 200 bis 300 Teile des aktiven Kaninchenserums nötig waren, um einen Teil Menschenserum seiner auslösenden Eiweißkörper zu berauben. Camus bestätigte diese Erscheinungen.“

Die nach den angeführten Beispielen zu folgernde Anschauung von der passiven Beteiligung des Immunserums am Niederschlage findet in den Versuchsergebnissen anderer Autoren eine, vielleicht scheinbare Einschränkung.

So fand P. Th. Müller[16]) im Niederschlag, den ein Laktoserum mit Milch gab (Laktopräzipitat), neben dem „Präzipitin“ noch Kasein. Ich kann den Befund von Kasein im Niederschlag bestätigen. Bezüglich der Deutung desselben verweise ich auf weiter unten folgende Bemerkungen.

Leblanc[17]) wies im Niederschlag, den ein entsprechendes Immunserum mit Hämoglobin gegeben hatte, solches neben Serumglobulin nach. Nach v. Dungern[18]) sind die „angewandten Methoden nicht einwandfrei genug, um dieses Ergebnis sicher zu stellen“.

Der Einwand, daß hier der Farbstoff bei der Niederschlags-

*) Zitiert nach Aschoff, „Ehrlichs Seitenkettentheorie“. Z. f. allgem. Physiol. I, 133.

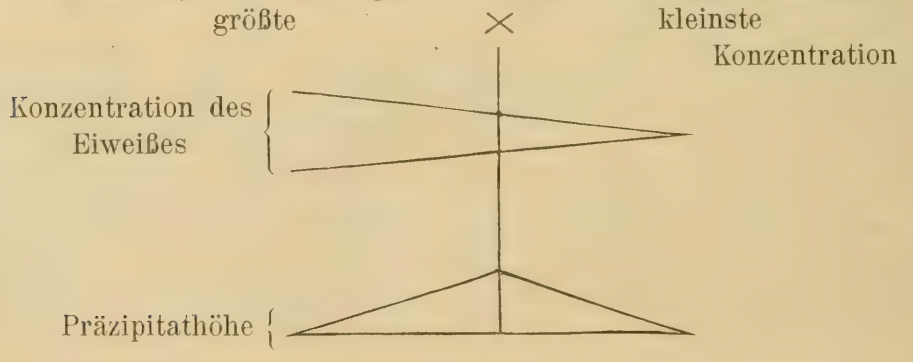
bildung mitgerissen wurde, trifft auch die von v. Dungern und Cohnheim[19]) mitgeteilten Versuche, in denen im Präzipitate, das das Serum eines mit Oktopusplasma behandelten Kaninchens mit dem Plasma gegeben hatte, Kupfer aus dem Hämocyanin des Plasmas nachgewiesen werden konnte.

Meine eigenen, bezüglich der Frage über die Herkunft des Präzipitates angestellten Versuche ergaben nun folgendes:

1. Ein kräftiges Immunserum (45 ccm) ließ nach Hinzufügen des zu den Injektionen verwendeten Globulins ein Präzipitat ausfallen, das 0,0724 g wog. Die zur Anstellung des Versuches sehr verdünnte Globulinlösung hatte im zugesetzten Volumen nur 0,0074 g Eiweiß enthalten.

2. Aus einem Immunserum wurden bei neutraler Reaktion die Globuline durch Halbsättigung mit Ammonsulfat ausgefällt. Der Niederschlag wurde aufs Filter gebracht, albuminfrei gewaschen, in Wasser gelöst und dialysiert. Die Dialyse wurde so lange fortgesetzt, bis mit Chlorbaryum nur noch eine leichte Trübung entstand. Ein weiteres Dialysieren war weder nötig noch angezeigt, da ja in salzfreier Lösung die Präzipitatbildung ausbleibt. Nachdem ich mich überzeugt hatte, daß die Globulinlösung bei Halbsättigung mit Ammonsulfat alles Eiweiß ausfallen ließ, wurde zu einer Probe die Hälfte des Volums von der zur Immunisierung verwendeten Albuminlösung zugesetzt. Das entstandene Präzipitat wurde aufs Filter gebracht, erst mit physiologischer Kochsalzlösung, hierauf mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat keine Eiweißreaktionen mehr gab, was sehr bald eintrat, so daß keine wesentliche Verdünnung des gesamten Filtrates und damit keine Verschiebung der Fällungsgrenzen verbunden war. In diesem Filtrate wurde das ganze zugesetzte Albumin quantitativ wiedergefunden, sodaß das Präzipitat nur aus den Globulinen des Immunserums stammen konnte.

3. Wenn man zu gleichen Mengen (2 ccm) des unverdünnten Immunserums die gleichen Volumina absteigend verdünnter Lösungen des zu den Injektionen angewandten Eiweißkörpers zufügt, so



erzielt man erst bei einer bestimmten Verdünnung der Eiweißlösung das stärkste Präzipitat. Bis zu dieser Probe wächst die Menge des Niederschlages und nimmt von da wieder ab.

Vorstehendes Schema läßt das Verhältnis einfach überschauen. Bei × war das stärkste Präzipitat.

Alle Proben wurden zum vollständigen Ausfallen und Absitzen des Niederschlages durch 24 Stunden bei 38° belassen. Die klare, über dem stärksten Präzipitat stehende Flüssigkeit wurde nun abpipettiert und in zwei gleiche Teile geteilt. Zu der einen Hälfte wurde neuerlich das gleiche Volumen Immunserum, zu der anderen ebensoviel Eiweißlösung gegeben. Schon nach kurzem Stehen bei 38° hatte sich in der ersten von beiden Proben ein neuerliches Präzipitat gebildet, während die letztere vollständig klar geblieben war. Nun konnte mit der zum zweitenmal gefällten Probe derselbe Vorgang mit gleichem Ergebnis wiederholt werden. Die über dem zweiten Präzipitat stehende Flüssigkeit ließ, abgehoben, auf Zusatz des gleichen Volumens Immunserum neuerdings einen Niederschlag im Gegensatz zu der mit Eiweißlösung versetzten Hälfte ausfallen. Das Spiel konnte 8 bis 12 mal, manchmal noch öfter wiederholt und so die Verdünnung der ursprünglich der ersten Probe zugesetzten Eiweißlösung ins Tausendfache, jedenfalls so weit getrieben werden, daß der Gedanke, sie als die Muttersubstanz so vieler Niederschläge anzusehen, hinfällig wird.

Die oben beschriebene paradoxe Erscheinung der Abnahme des Präzipitates mit Zunahme der Konzentration der zur Hervorrufung derselben zum Immunserum zugesetzten Eiweißlösung wird allgemein auf eine Hemmung der Reaktion, das ist der Niederschlagsbildung zurückgeführt. Es war wünschenswert, zu untersuchen, ob auch in unserem Falle diese Erscheinung tatsächlich in einer gehemmten Präzipitatbildung ihren Grund habe oder ob das Präzipitat zwar gebildet, aber durch die lösende Wirkung eines anderen Eiweißkörpers nur am Ausfallen gehindert werde. Eisenberg[20]) gibt der Ansicht Ausdruck, „daß der spezifische Niederschlag bis zu einem gewissen Grade im Überschuß der Eiweißlösung (Eiereiweiß) löslich ist, etwa wie Alkalialbuminat mit Säuren Niederschläge gibt, die sich im Überschuß der Säure auflösen". Da das Präzipitat, wenigstens in seinen physikalischen Reaktionen einem Alkalialbuminat gleicht – ein solches aber kann, wie in einer vorhergehenden Arbeit[1]) gezeigt wird, durch Pseudoglobulin bis zu einem gewissen Maße in Lösung gehalten werden —, so brauchte nur die über dem geringen Niederschlage stehende Flüssigkeit auf Albuminat untersucht zu werden. Dies geschah in der Weise, daß der bei Drittelsättigung mit Ammonsulfat aus derselben ausgefallene Niederschlag so lange mit der entsprechenden (33 proz.) Ammonsulfatlösung gewaschen wurde, bis das Filtrat eiweiß- und alkalifrei war und dann auf seine Wasserlöslichkeit untersucht wurde. Da nun der Niederschlag auf Wasserzusatz sich vollkommen löste, so war

damit erwiesen, daß kein Albuminat bzw. Präzipitat gebildet und in Lösung gehalten worden war. Somit ist bewiesen, daß das geschilderte Phänomen, welches allgemein gesprochen darin besteht, daß ein Überschuß an reagierender Substanz einen geringeren Effekt auslöst, nicht im Gelöstbleiben des Niederschlages, sondern tatsächlich in einer Hemmung der Reaktion seine Ursache hat.

4. Bezüglich der Angaben von P. Th. Müller, welcher, wie schon oben erwähnt, im Laktopräzipitat neben Kasein noch „Präzipitin" nachwies, sei erwähnt, daß in einem gleichsinnigen Versuche, welchen ich mit Laktoserum und Milch vorgenommen habe, beim Optimum der Ausfällung die über dem Präzipitat stehende klare Flüssigkeit zwar kein Kasein mehr enthielt, wie die Wirkungslosigkeit von Labzusatz bewies, wohl aber imstande war, mit neuen Serummengen einen Niederschlag ausfallen zu lassen. Da dieser jetzt kein Kasein mehr enthalten konnte, so ist in Anbetracht der Leichtigkeit, mit welcher Kasein aus seiner Lösung abgeschieden wird, die Annahme berechtigt, daß das in dem zuerst ausgefallenen Präzipitat befindliche Kasein beim Ausfallen des Immunserums nur mitgerissen worden war.

Aus dem Mitgeteilten ergibt sich der Schluß, daß das Präzipitat zum allergrößten Teile aus den Eiweißkörpern des Immunserums stammt, womit jedoch nicht in Abrede gestellt werden soll, daß in einzelnen Fällen in das Präzipitat auch Bestandteile der fällenden Eiweißlösung eingehen.

Ohne Vorschläge für eine auf dieser Erkenntnis basierende Änderung der bisher üblichen Nomenklatur machen zu wollen, halte ich es doch für notwendig, der Erscheinung, welche beim Vermischen eines Eiweißimmunserums mit dem Immunisierungsmaterial (oder einem anderen Eiweißkörper) beobachtet wird, folgende Deutung zu geben: das Immunserum, das passive Reagens, das Fällungssubstrat, wird durch das Immunisierungsmaterial, das aktive Reagens, das Fällungsmittel, ausgefällt. Bezeichnet man mit dem Ausdruck „Präzipitin" den im Immunblut gelöst vorhandenen, neugebildeten, mehr oder minder spezifischen Eiweißkörper, der durch einen zweiten fällbar ist, so bezeichne „Präzipitat" die in unlöslicher Form ausgefällte Modifikation desselben. Präzipitin und Präzipitat stehen zueinander in Beziehung etwa wie Fibrinogen zu Fibrin.

Das Immunserum mußte demnach eine Veränderung erlitten haben, welche sehr wohl identisch sein konnte mit der von mir gefundenen Globulinvermehrung. Diese Annahme wird durch die Feststellung von Fuhrmann[21]) und Umber[8]), nach welchen die

„Präzipitinwirkung“ an die Globulinfraktion gebunden sei, trotz der entgegensetzten Deutung des Präzipitierungsvorganges, gestützt. In der Tat wird, wie ich nach eigenen Versuchen bestätigen kann, nur die Globulinfraktion, nicht aber das Albumin eines Immunserums durch das fällende Eiweiß (Immunisierungsmaterial) niedergeschlagen.

In allen obigen Fällen von Globulinvermehrung war die Präzipitatbildung deutlich und konstant vorhanden. Dort, wo das Serum weder mit dem Immunisierungsmaterial noch mit anderen verschiedenen Eiweißkörpern Niederschlag gegeben hatte, fehlte auch die Vermehrung der Globuline. Solche Fälle liegen vor bei den Seris XIII und XIV, wo Kaninchen mit Kaninchenserum, und bei Serum XII (einer von zwei gleichartigen Versuchen), wo das Kaninchen mit aus Pferdeserum dargestelltem Alkalialbuminat injiziert worden war.

Es scheint demnach im höchsten Grade wahrscheinlich, daß bei der Immunisierung gegen Proteinstoffe im Blute Substanzen entstehen, welche, mit den Immunisierungsmaterialien zusammengebracht, unlösliche Verbindungen eingehen und ausfallen, und wegen der gleichen Fällungsgrenzen eine Globulinvermehrung im Serum in Erscheinung treten lassen. Daß diese Körper übrigens keine eigentlichen, mit den normalen identische Globuline sind, dafür spricht neben der Unwirksamkeit normaler Sera der Umstand, daß eine auf andere Weise erzielte Globulinvermehrung in einem Serum diesem nicht die Eigenschaft erteilt, von Eiweißkörpern gefällt zu werden. Wie ich a. a. O.[1]) mitgeteilt habe, gelingt es durch halbstündiges Erwärmen auf 56° Albumin in Globulin umzuwandeln, somit unter Vermeidung von Alkalialbuminatbildung eine Globulinanreicherung im Serum zu erzielen. Solche Sera werden ebensowenig wie die nativen Sera durch Eiweißkörper gefällt.

Bei halbstündigem Erwärmen von Immunseris auf 56° tritt ebenfalls eine Vermehrung der Globuline ein, ohne daß die Präzipitatbildung eine Steigerung erfährt.

Es wird Sache fernerer Untersuchungen sein, die durch Immunisierung gebildeten mehr oder minder spezifischen Globuline, welche die Präzipitatreaktion geben, von den normal vorhandenen zu isolieren und die chemischen Unterscheidungsmerkmale festzustellen.

Somit scheint wenigstens für die Präzipitinbildung der Nachweis geliefert zu sein, daß in der Blutveränderung (Globulinver-

mehrung) nicht eine bloße Begleiterscheinung, sondern eine wesentliche, sie bedingende Veränderung gegeben ist. Inwieweit die gleichzeitig vorhandene (s. Fußnote S. 582) Leukocyten- und Fibrinogenvermehrung mit der erlangten Immunität im Zusammenhange steht, müßten erst weitere darauf gerichtete Untersuchungen, die auch auf die homologen Veränderungen der Eiweißkörper der Organe einzugehen hätten, feststellen. Doch läßt sich schon jetzt auf Grund der Versuchsergebnisse von Alex. Schmidt eine Vermutung äußern. Hammarsten[22]) schreibt: „Das Serumglobulin stammt nach Alex. Schmidt von den schon vor der Gerinnung des gelassenen Blutes massenhaft zugrunde gehenden weißen Blutkörperchen. Es gelang ihm auch, aus den isolierten gewaschenen Leukocyten Paraglobulin (Serumglobulin) zu gewinnen. Die Ansicht, daß die ganze Globulinmenge des Blutserums aus den Leukocyten stammt, scheint allerdings später von Alex. Schmidt verlassen worden zu sein. Dagegen nahm er fortwährend an, daß immer ein Teil der Serumglobuline diesen Ursprung hat, eine Annahme, die wohl allgemein als richtig anerkannt worden ist."

Es ist demnach nicht unwahrscheinlich, daß die bei der Immunisierung entstehenden mehr oder minder spezifischen Globuline ihren Ursprung ebenfalls vermehrt auftretenden und wieder zerfallenden Leukocyten verdanken.

Vorstehende Untersuchung wurde mit Unterstützung der „Gesellschaft für deutsche Kunst, Wissenschaft und Literatur in Böhmen" ausgeführt.

Literaturverzeichnis.

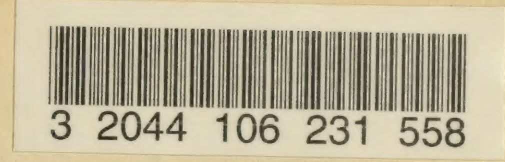
1) L. Moll, „Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin". Diese Beiträge **4**, 563.
2) W. Seng, Zeitschrift f. Hygiene u. Infekt. **31**, 513.
3) Atkinson, Journ. of exp. med. **5**.
4) Joachim, Arch. für die gesamte Physiol. **93**.
5) E. P. Pick, Diese Beiträge **1**, 357.
6) M. Jakoby, Diese Beiträge **1**, 59.
7) Rostoski, Münch. med. Wochenschr. 1902, S. 740.
8) Umber, Berl. klin. Wochenschr. 1902, S. 657.
9) Reye, Straßburger Dissertat. 1898.
10) v. Dungern, Die Antikörper 1903, S. 62 (Verlag Fischer, Jena).
11) Uhlenhuth, Deutsche med. Wochenschr. Nr. 46, 1900.
12) Wassermann und Schütze, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 7, 1901.
13) Stern, Deutsche med. Wochenschr. Nr. 9, 1901.
14) E. P. Pick, loc. cit.
15) Linossier und Lemoine, C. r. d. l. Soc. de Biol. 1902, S. 85.
16) P. Th. Müller, Archiv f. Hygiene **44**, 1902.

[17] Leblanc, La Cellule **1**, Nr. 18, 1901.
[18] v. Dungern, loc. cit. S. 69.
[19] v. Dungern, loc. cit. S. 75.
[20] Eisenberg, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Abt. I. Orig.-Bd. **31**, 1902.
[21] F. Fuhrmann, Diese Beiträge **3**, 417.
[22] Hammarsten, Ergebnisse der Physiologie 1902, S. 348.

Berichtigung.

S. 349, Zeile 9 von unten lies: **1,71** statt 1,17 (Proz. Ca).
S. 452, Zeile 9 von unten lies: 749 verdünntes Blut = **37** g Blut.

Buchdruckerei A. W. Zickfeldt, Osterwieck/Harz.


3 2044 106 231 558

